

UNIVERZITA KARLOVA V PRAZE

Přírodovědecká fakulta

Studijní program: Chemie

Studijní obor: Analytická chemie



Bc. Eva Horáková

VOLTAMETRICKÉ STANOVENÍ GENOTOXICKÝCH NITROBIFENYLŮ

Voltammetric Determination of Genotoxic Nitrobiphenyls

Diplomová práce

Vedoucí diplomové práce: RNDr. Vlastimil Vyskočil, Ph.D.

Praha 2012

Tato diplomová práce vznikla v souvislosti s řešením výzkumného záměru MSM0021620857. Z tohoto výzkumného záměru byla také spolufinancována a dále finančně podpořena Univerzitou Karlovou v Praze (projekt UNCE 2012/44) a Grantovou agenturou České republiky (projekt P206/12/G151).

Prohlášení

Prohlašuji, že jsem tuto závěrečnou práci zpracovala samostatně a že jsem uvedla všechny použité informační zdroje a literaturu. Tato práce ani její podstatná část nebyla předložena k získání jiného nebo stejného akademického titulu.

Jsem si vědoma toho, že případné využití výsledků, získaných v této práci, mimo Univerzitu Karlovu, je možné pouze po písemném souhlasu této univerzity.

V Praze dne 15. května 2012

.....

podpis

ABSTRAKT

Tato diplomová práce se zabývá stanovením 4-nitrobifenyly (4-NBP) technikami DC voltametrie (DCV) a diferenční pulzní volumetrie (DPV) na rtuťovém meniskem modifikované stříbrné pevné amalgámové elektrodě (m-AgSAE) v modelových vzorcích říční vody (v tomto bodě diplomová práce navazuje na předchozí bakalářskou práci, v rámci které byly vyvinuty DCV a DPV metody pro stanovení 4-NBP v deionizované vodě). Bylo dosaženo meze stanovitelnosti (LOD) $2 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ metodou DCV a $4 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ metodou DPV. K dosažení nižší LOD byla otestována technika adsorpční rozpouštěcí DPV (AdSDPV), nebyly však nalezeny podmínky, při nichž by se analyt významně akumuloval na povrchu m-AgSAE.

Dále bylo studováno elektrochemické chování 2-nitrobifenyly (2-NBP) na m-AgSAE a hledány optimální podmínky pro jeho stanovení technikami DCV a DPV. Jako optimální prostředí pro obě techniky bylo zvoleno prostředí methanol-0,01 $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ LiOH (1:9), ve kterém byly proměřeny koncentrační závislosti v rozmezí $1 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ až $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 2-NBP ($LOD \approx 2 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ pro DCV a $1 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ pro DPV). Vyvinuté metody byly úspěšně aplikovány při stanovení 2-NBP v modelových vzorcích pitné a říční vody. Pro obě matrice bylo metodou DCV dosaženo LOD $2 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a metodou DPV $1 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Dále byla testována technika AdSDPV k dosažení nižší LOD 2-NBP, nebyly však nalezeny podmínky pro využitelnou akumulaci analytu.

Byly nalezeny optimální podmínky pro stanovení 2-NBP a 4-NBP ve směsi technikou DPV na m-AgSAE: methanol-0,10 $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ acetátový pufr pH 6,0 (3:7). Pro koncentrační řády 10^{-6} a $10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ byla proměřena závislost výšky píku 4-NBP na koncentraci 2-NBP a závislost výšky píku 2-NBP na koncentraci 4-NBP.

Technikou cyklické voltametrie (CV) na HMDE a m-AgSAE v prostředí methanol-Brittonův-Robinsonův pufr (pH 2,1; 7,0 a 13,1) (3:7) bylo zjištěno, že v rozsahu polarizačních rychlostí 5–200 $\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$ jsou závislosti proudu píku 4-NBP a 2-NBP na odmocnině z rychlosti polarizace lineární. V tomto rozsahu polarizačních rychlostí jsou tedy rychlosti redukčních dějů probíhajících na povrchu elektrody řízeny difúzí.

V prostředí ethanol-0,25 $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ fosfátový pufr pH 7,0 (1:1) a (1:9) byl technikou DPV na HMDE studován vliv přítomnosti dvouřetězcové DNA ($dsDNA$) na elektrochemické chování 4-NBP, 2-NBP, 3-nitrobifenyly, nitrobenzenu a 4-nitrofenolu. Koncentrace DNA ve studovaném roztoku byly 2–2500 $\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$. Bylo zjištěno, že na elektrochemické chování studovaných látek za přítomnosti $dsDNA$ v měřeném roztoku má vliv obsah ethanolu. Byla rovněž studována možnost využití rozdílné interakce studovaných látek s $dsDNA$ k oddělení jejich voltametrických signálů.

ABSTRACT

The presented diploma thesis is devoted to study of determination of 4-nitrobiphenyl (4-NBP) in model river water by DC voltammetry (DCV) and differential pulse voltammetry (DPV) at m-AgSAE (diploma thesis relates to bachelor thesis, in it DCV and DPV methods for determination of 4-NBP in deionized water were developed). Limit of determination (*LOD*) is $2 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ by DCV and $4 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ by DPV. The adsorptive stripping DPV (AdSDPV) technique was tested to archive lower *LOD* the AdSDPV, optimal conditions were not found.

Electrochemical behavior of 2-nitrobiphenyl (2-NBP) at m-AgSAE was studied. Optimal conditions for its determination by both techniques DCV and DPV were found in methanol-0,01 $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ LiOH (1:9) and in this medium peak current dependence in $1 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ to $1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ 2-NBP (*LOD* $\approx 2 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ by DCV and $1 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ by DPV) concentration range was measured. Developed methods were successfully tested for determination of 2-NBP in drinking and river water samples. For both mediums obtained *LODs* were $2 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ by DCV and $1 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ by DPV. AdSDPV technique was unsuccessfully tested to achieve lower *LOD*.

Optimal conditions for simultaneous determination of 4-NBP and 2-NBP by DPV technique at m-AgSAE were found: methanol-0,25 $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ acetate buffer (pH = 6,0) 3:7. The dependence of the peak current of 4-NBP on concentration of 2-NBP and dependence of peak current of 2-NBP on concentration of 4-NBP was studied for 10^{-6} and $10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ concentration range.

Using cyclic voltammetric (CV) technique at HMDE and m-AgSAE in medium methanol-Britton-Robinson buffer (pH 2,1; 7,0 and 13,1) 3:7 it was found that the dependence of peak current of 4-NBP and 2-NBP on square root of scan rate is linear for 5–500 $\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$ scan rate range. This fact confirms that reduction processes at electrode surface is controlled by diffusion for this scan rate range.

In medium ethanol-0,25 $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ phosphate buffer (pH 7,0) (1:1) and (1:9) the effect of double-stranded DNA (*dsDNA*) presence ($C_{\text{DNA}} = 2\text{--}2500 \mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$) in solution on electrochemical behavior of 4-NBP, 2-NBP, 3-nitrobiphenyl, nitrobenzene and 4-nitrophenol was studied at HMDE by DPV technique. It was found that the electrochemical behavior of studied compounds is influenced by ethanol content. Possibility of using different interaction of studied compounds with *dsDNA* for separation of its signals was studied.

Ráda bych poděkovala svému školiteli RNDr. Vlastimilu Vyskočilovi, Ph.D. za odborné vedení a Prof. RNDr. Jiřímu Barkovi, CSc. a všem členům katedry za všestrannou pomoc a cenné rady.

Dále bych touto cestou také chtěla poděkovat mým rodičům, že mi umožnili studium na vysoké škole a i ostatním svým blízkým za jejich podporu.

Předmětová hesla: analytická chemie
elektrochemie
nitrované polyaromatické uhlovodíky
voltametrie

Klíčová slova: 4-nitrobifenyl
2-nitrobifenyl
DC voltametrie
diferenční pulzní voltametrie
stříbrná pevná amalgamová elektroda
visící rtuťová kapková elektroda
elektrody modifikované DNA

Objective Words: Analytical Chemistry
Electrochemistry
Nitrated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons
Voltammetry

Key Words: 4-Nitrobiphenyl
2-Nitrobiphenyl
DC Voltammetry
Differential Pulse Voltammetry
Silver Solid Amalgam Electrode
Hanging Mercury Drop Electrode
DNA-Modified Electrodes

Seznam použitých zkratk a symbolů

2-NBP	2-nitrobifenyl
3-NBP	3-nitrobifenyl
4-NBP	4-nitrobifenyl
4-ABP	4-aminobifenyl
4-ABP- <i>N</i> -OH	4-hydroxylaminobifenyl
APAH	aminoderiváty polycyklických aromatických uhlovodíků
BR pufr	Brittonův-Robinsonův pufr
<i>c</i>	molární koncentrace [$\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]
<i>c_V</i>	molární koncentrace v pitné vodě [$\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]
<i>c_{RV}</i>	molární koncentrace v říční vodě [$\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]
CAS	Chemical Abstract Services
CV	cyklická voltametrie
DCV	DC voltametrie (direct current voltammetry)
DNA	deoxyribonukleová kyselina (deoxyribo nucleic acid)
DPV	diferenční pulzní voltametrie
<i>ds</i> DNA	dvouřetězcová deoxyribonukleová kyselina (double-stranded deoxyribonucleic acid)
<i>E</i>	potenciál [mV]
<i>E_{acc}</i>	potenciál akumulace [mV]
<i>E_p</i>	potenciál píku [mV]
<i>E_{reg,1}</i>	počáteční potenciál regenerace [mV]
<i>E_{reg,2}</i>	konečný potenciál regenerace [mV]
ECD	elektrochemická detekce
EDTA	ethylendiamintetraoctová kyselina (komplexon II, Chelaton II)
EtOH	ethanol
GC	plynová chromatografie
HMDE	visící rtuťová kapková elektroda
HPLC	vysokoučinná kapalinová chromatografie
<i>I</i>	proud [nA]
<i>I_p</i>	proud (výška) píku [nA]
IARC	International Agency for Research on Cancer

<i>LOD</i>	mez stanovitelnosti [$\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$]
LUMO	nejnižší neobsazený molekulový orbital (Lowest Unoccupied Molecular Orbital)
m-AgSAE	rtuťovým meniskem modifikovaná stříbrná pevná amalgámová elektroda
MeOH	methanol
M_r	relativní molekulová hmotnost
MS	hmotnostní spektrometrie
NB	nitrobenzen
NPAH	nitrované polycyklické aromatické uhlovodíky
PAH	polycyklické aromatické uhlovodíky
PB	fosfátový pufr
PNP	4-nitrofenol
<i>RSD</i>	relativní směrodatná odchylka
<i>t</i>	čas [s; min; den]
t_{acc}	doba akumulace [s; min; den]
Tris-HCl	tris(hydroxymethyl)aminomethan hydrochloridu
UV-VIS	ultra fialová-viditelná oblast (ultraviolet/visible)
<i>V</i>	objem [ml]
ν_{sc}	rychlost polarizace [$\text{mV}\cdot\text{s}^{-1}$]

OBSAH

1	Úvod	11
1.1	Cíle práce	11
1.2	Shrnutí výsledků bakalářské práce	12
1.3	Studované látky	13
1.3.1	Analytické metody stanovení NPAH	15
1.3.2	4-Nitrobifenyl	16
1.3.3	2-Nitrobifenyl	16
1.3.4	Ostatní studované látky	17
1.3.5	Deoxyribonukleová kyselina	18
1.4	Použité elektrody	19
1.4.1	HMDE	19
1.4.2	m-AgSAE	19
1.5	Asociace DNA s nízkomolekulárními látkami	20
1.6	Voltametrické stanovení směsi	21
2	Experimentální část	22
2.1	Reagencie	22
2.2	Aparatura	23
2.3	Použité pracovní elektrody	24
2.3.1	HMDE	24
2.3.2	m-AgSAE	24
2.4	Pracovní postupy	25
2.5	Zpracování výsledků a statistické vyhodnocení získaných dat	26
3	Výsledky a diskuze	27
3.1	Voltametrické stanovení 4-nitrobifenyly	27
3.1.1	Voltametrické stanovení 4-NBP v modelových vzorcích říční vody	27
3.1.2	Adsorpční rozpouštěcí diferenční pulzní voltametrie 4-NBP	28
3.2	Voltametrické stanovení 2-nitrobifenyly	29
3.2.1	Optimalizace podmínek měření	29
3.2.2	Koncentrační závislost	31
3.2.3	Voltametrické stanovení 2-NBP v modelových vzorcích vody	32
3.2.4	Adsorpční rozpouštěcí diferenční pulzní voltametrie 2-NBP	35

3.3	Stanovení směsi 4-NBP a 2-NBP metodou DPV na m-AgSAE.....	36
3.3.1	Optimalizace prostředí.....	36
3.3.2	DPV 4-NBP a 2-NBP ve směsi.....	38
3.4	Cyklická voltametrie	41
3.5	Interakce studovaných látek s DNA	45
3.5.1	Optimalizace složení základního elektrolytu	45
3.5.2	Vliv matrice roztoku DNA	46
3.5.3	Interakce studovaných látek s DNA	48
3.5.4	Vliv obsahu ethanolu	52
3.5.5	Stanovení směsi studovaných látek s využitím rozdílné interakce s DNA.....	53
4	Závěr.....	54
5	Literatura	56

1 ÚVOD

1.1 Cíle práce

Tato práce vznikla na Katedře analytické chemie Přírodovědecké fakulty Univerzity Karlovy v Praze, kde v rámci UNESCO laboratoře elektrochemie životního prostředí probíhá výzkum elektrochemického chování karcinogenních a genotoxických organických sloučenin a vývoj elektrochemických metod jejich stanovení. Diplomová práce navazuje na bakalářskou práci [1], která byla vypracována v roce 2010 a zabývala se studiem elektrochemického stanovení 4-nitrobifenyly (4-NBP).

Předkládaná diplomová práce měla stanovené následující cíle:

1. Ověření aplikovatelnosti v bakalářské práci vyvinutých metod pro stanovení 4-NBP (stanovení analytu pomocí DC voltametrie (DCV) a diferenční pulzní voltametrie (DPV) na rtuťovém meniskem modifikované stříbrné pevné amalgamové elektrodě (m-AgSAE)) [1] na modelových vzorcích říční vody a prověření možnosti využití adsorpční rozpouštěcí diferenční pulzní voltametrie (AdSDPV) ke snížení meze stanovitelnosti (*LOD*).
2. Prostudování elektrochemického chování 2-nitrobifenyly (2-NBP), nalezení optimálních podmínek jeho stanovení pomocí DCV a DPV na m-AgSAE, dosažení co nejnižší *LOD*, otestování techniky AdSDPV k jeho stanovení a ověření vyvinutých metod ke stanovení 2-NBP v modelových vzorcích pitné a říční vody. Srovnání získaných výsledků s výsledky dosaženými na HMDE (dříve publikováno v diplomové práci Radka Štěpána [2]).
3. Vyvinutí metody simultánního stanovení 4-NBP a 2-NBP (tyto analyty se mohou vyskytovat ve vzorcích společně) pomocí DPV na m-AgSAE a porovnání dosažených výsledků se stanovením technikou DPV na HMDE [2].
4. Prostudování průběhu elektrochemické redukce obou zkoumaných látek na HMDE a na m-AgSAE pomocí cyklické voltametrie (CV).
5. Základní prostudování interakcí 4-NBP a 2-NBP s DNA (pro budoucí studium interakcí environmentálních organických polutantů a vývoj elektrochemických DNA biosenzorů; studované látky mohou interagovat s DNA, tato interakce se projevuje posunem potenciálu píku (E_p) při měření technikou DPV na HMDE).
6. Využití rozdílné interakce vybraných nitrovaných polycyklických aromatických uhlovodíků (NPAH), které se mohou vyskytovat v environmentálních vzorcích společně se 4-NBP, s DNA ke stanovení těchto látek ve směsi.

1.2 Shrnutí výsledků bakalářské práce

V rámci bakalářské práce [1] bylo studováno elektrochemické chování 4-NBP a vyvinuty citlivé metody jeho stanovení pomocí technik DCV a DPV na m-AgSAE. Metoda byla ověřena pro modelové vzorky pitné vody.

Optimálním prostředím pro stanovení 4-NBP v deionizované vodě je methanol-0,25 mol·l⁻¹ acetátový pufr o pH 4,8 (3:7). Při použití metody DCV není nutné použít elektrochemickou regeneraci, při metodě DPV je její použití vhodné s pomocí pulzů $E_{\text{reg},1} = 0 \text{ mV}$ a $E_{\text{reg},2} = -1300 \text{ mV}$. Pro obě metody byly nalezeny lineární koncentrační závislosti proudu píku 4-NBP v koncentračních řádech 10^{-5} , 10^{-6} a $10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Oběma metodami bylo dosaženo meze stanovitelnosti $2 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Stanovením 4-NBP v modelových vzorcích pitná voda-0,25 mol·l⁻¹ acetátový pufr o pH 4,8 (9:1) bylo dosaženo metodou DCV bez regenerace i metodou DPV s regenerací ($E_{\text{reg},1} = 0 \text{ mV}$, $E_{\text{reg},2} = -1300 \text{ mV}$) meze stanovitelnosti $2 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

1.3 Studované látky

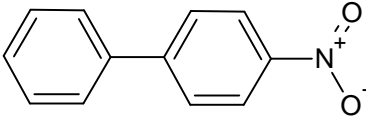
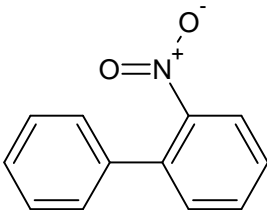
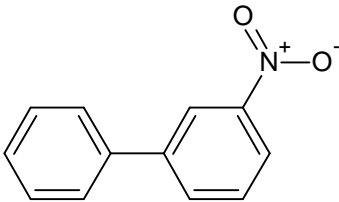
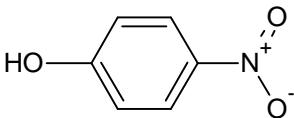
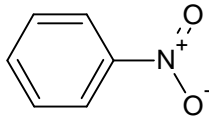
Všechny studované látky patří do skupiny nitrovaných polycyklických aromatických uhlovodíků (NPAH), které vznikají v motorech při spalování naftových i benzinových paliv a v atmosféře reakcí příslušných polyaromatických uhlovodíků (PAH) s oxidy dusíku. Dále se NPAH vyskytují v cigaretovém kouři, přírodních i odpadních vodách a v některých potravinách [3, 4]. Bylo prokázáno, že mutagenní a karcinogenní účinky NPAH bývají často vyšší, než jejich matečných PAH [3]. Metabolickou přeměnou NPAH vznikají hydroxylaminy PAH [5, 6], které se kovalentně váží na hemoglobin [7], a APAH. Koncentrace NPAH ve vzorcích vzduchu se pohybují řádově v desítkách $\text{pg} \cdot \text{m}^{-3}$ [8].

Tato fakta vedou ke zvýšenému zájmu o jejich sledování v životním [9] i pracovním prostředí [10] a ke snaze předvídat a studovat jejich biologické účinky. Mutagenní účinky lze předpovědět na základě znalosti hodnoty půlvlnového potenciálu $E_{1/2}$, který souvisí s energií LUMO - z této hodnoty lze tedy mutagenitu NPAH odvodit [11].

Ke stanovení NPAH bylo vyvinuto množství metod, které jsou určeny pro různé matrice. Vzhledem ke složitosti matric je u všech typů vzorků nutná předběžná extrakce a čištění [12-14].

Studované látky jsou shrnuty v tab. 1.1.

Tab. 1.1 Přehled studovaných látek.

4-nitrobifenyl	zkratka: 4-NBP
<p>CAS Name: 1,1'-Biphenyl, 4-nitro-</p> <p>CAS Registry Number: 92-93-3</p> <p>Sumární vzorec: $C_{12}H_9NO_2$</p> <p>Relativní molekulová hmotnost: 199,21</p>	
2-nitrobifenyl	zkratka: 2-NBP
<p>CAS Name: 1,1'-Biphenyl, 2-nitro-</p> <p>CAS Registry Number: 86-00-0</p> <p>Sumární vzorec: $C_{12}H_9NO_2$</p> <p>Relativní molekulová hmotnost: 199,21</p>	
3-nitrobifenyl	zkratka: 3-NBP
<p>CAS Name: 1,1'-Biphenyl, 3-nitro-</p> <p>CAS Registry Number: 2113-58-8</p> <p>Sumární vzorec: $C_{12}H_9NO_2$</p> <p>Relativní molekulová hmotnost: 199,21</p>	
4-nitrofenol	zkratka: PNP
<p>CAS Name: Phenol, 4-nitro-</p> <p>CAS Registry Number: 100-02-7</p> <p>Sumární vzorec: $C_6H_5NO_3$</p> <p>Relativní molekulová hmotnost: 139,11</p>	
Nitrobenzen	zkratka: NB
<p>CAS Name: Benzene, nitro-</p> <p>CAS Registry Number:</p> <p>Sumární vzorec: $C_6H_5NO_2$</p> <p>Relativní molekulová hmotnost: 123,06</p>	

1.3.1 Analytické metody stanovení NPAH

Chromatografické techniky stanovení NPAH

Ke stanovení NPAH v životním prostředí, při analýze ovzduší [9, 14-18] i analýze vody [19], a biologických vzorků jsou díky vysoké selektivitě a citlivosti hojně využívané chromatografické metody analýzy.

Nejúčinnější je plynová chromatografie GC-MS [16], GC-ECD [18, 20, 21], s limity detekce v závislosti na typu detektoru řádově $10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Metodou GC-MS lze detekovat až 50 látek ve vzorku.

Při analýze pomocí HPLC se používají kolony s reversními fázemi C18 a jako mobilní fáze methanol/voda nebo acetonitril/voda. Mezi používané detektory patří citlivější ECD a UV-VIS. Dalším detektorem vhodným pro analýzu NPAH je hmotnostní, fluorescenční a chemiluminiscenční detektor [15, 22-24]. Poslední dva detektory jsou velmi citlivé, ale NPAH je nutné před analýzou převést na APAH.

Elektrochemické stanovení NPAH

Díky snadné redukovatelnosti nitroskupiny jsou voltametrické a polarografické metody citlivou a zároveň finančně nenáročnou možností stanovení NPAH v environmentálních vzorcích. Využívají se především metody DPV a AdSDPV, kterými lze dosáhnout mezí stanovitelnosti $10^{-7} - 10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Spojením separačních technik a elektrochemické detekce (HPLC-ECD) lze získat citlivé metody analýzy NPAH [4, 17, 21].

Hodnota půlvlnového potenciálu ($E_{1/2}$) poskytuje informaci o mutagenitě dané sloučeniny. Studie provedené na *Salmonella typhimurium* ukazují, že $E_{1/2}$ lineárně závisí na logaritmu hodnoty přiřazené mutagenitě [11, 25].

Spektrometrické stanovení NPAH

Díky přítomnosti aromatického jádra a nitroskupiny, které absorbují záření v oblasti UV-VIS, je možné látky stanovovat spektrofotometricky. Dalšími metodami je hmotnostní spektroskopie a fluorescenční spektroskopie, u které je však nutné NPAH převést na APAH.

Spektrometrické metody stanovení NPAH nacházejí uplatnění především jako detekční techniky separačních metod [16, 22, 26].

1.3.2 4-Nitrobifenyl

Čistá látka má za laboratorních podmínek krystalickou strukturu a žlutou barvu. Je omezeně rozpustná ve vodě, proto je nutné pracovat ve směsném prostředí [27, 28].

Díky přítomnosti nitroskupiny lze látku detekovat voltametriky – redukcí na 4-aminobifenyl (4-ABP) v kyselém prostředí, na 4-hydroxylaminobifenyl (4-ABP-*N*-OH) v bazickém prostředí.

Dle International Agency for Research on Cancer (IARC) [29] je 4-NBP zařazen ve skupině 3 – tj. látka, u které nebyla karcinogenita pro člověka prokázána. Karcinogenní účinky 4-NBP byly testovány na zvířatech [30, 31]. Výsledky studií provedených v posledních 30 letech na preparátech jater králíků [6] a krys [32] a vzorcích cytosolu a mikrozomů plic člověka [33] ukazují, že 4-NBP je pomocí cytochromu P-450 metabolicky přeměněn na 4-ABP (který je dle IARC [34] zařazen ve skupině 1 – látky pro člověka karcinogenní), 4-ABP-*N*-OH, podezřelý z karcinogenity, a 4-nitrosobifenyl. Výsledky studií na *Salmonella Thyphimurium* ukazují, že methyloací 4-NBP lze jeho mutagenní účinek zmírnit [35].

Ke stanovení 4-NBP byly vyvinuty citlivé metody chromatografické [16, 21, 36, 37] i spektrofotometrické [23]. Elektrochemickým chováním a stanovením se zbýval Hernández a kol., ti dosáhli metodou diferenční pulzní polarografie *LOD* řádově $10^{-10} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ [38]. Práce Barka a kol. [39] zahrnuje voltametrické stanovení na rtuťové a uhlíkové diskové elektrodě s dosaženými mezemi stanovitelnosti řádově $10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Štěpán [2] dosáhl metodou AdSDPV na HMDE meze stanovitelnosti $3,3 \cdot 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

1.3.3 2-Nitrobifenyl

Čistá látka má za laboratorní teploty žlutou barvu a krystalickou strukturu, je omezeně rozpustná ve vodě, takže je nutné pracovat ve směsném prostředí [40].

V průmyslu se 2-NBP používá k barvení a jako změkčovaadlo [41], není na žádném seznamu IARC, je podezřelý z mutagenních účinků a pro práci s ním se doporučuje použití ochranných pomůcek. Jsou dostupné výsledky testů biologických účinků 2-NBP na zvířata a bakterie. Mezi akutní účinky pozorované u zvířat patří kóma, dýchavičnost, úbytek váhy [30].

Možnosti stanovení 2-NBP jsou stejné jako u 4-NBP a i meze stanovitelnosti jsou obdobné [16, 17]. Meze stanovitelnosti dosažené elektrochemickými metodami - např. metodou AdSDPV na HMDE [42] jsou řádově $10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

1.3.4 Ostatní studované látky

Dalšími látkami, jejichž chování bylo studováno v souvislosti interakce s DNA, byly: 3-nitrobifenyl (3-NBP), nitrobenzen (NB) a 4-nitrofenol (PNP).

3-Nitrobifenyl

Stejně jako 2-NBP a 4-NBP je 3-NBP omezeně rozpustný ve vodě, proto je i s touto látkou nutné pracovat ve směsném prostředí [43].

Práce, které se zabývají stanovením 3-NBP, jsou například studie Barka a kol. [20] – HPLC-ECD, další chromatografické stanovení nabízí metoda GC-ECD [17] a GC-MS [16]. Elektrochemickým stanovením se zabýval Štěpán a kol. [42] – stanovení voltametrickými metodami na HMDE, kde dosažené meze stanovitelnosti byly řádově $10^{-8} - 10^{-9} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

4-Nitrofenol

Za laboratorních podmínek má čistý PNP formu žlutých krystalů, které se rozpouštějí ve vodě [44].

Ve farmaceutickém průmyslu slouží PNP jako výchozí látka pro výrobu paracetamolu [45], dále se používá v barvicím průmyslu a k výrobě insekticidů a hnojiv. Dle IARC není PNP látkou podezřelou z karcinogenních účinků. Chronické účinky působení PNP na člověka nejsou známy, při pokusech na zvířatech bylo zaznamenáno pouze podráždění kůže při dermálním podání. Akutní inhalace nebo požití se u člověka projevují bolestmi hlavy, malátností a průjmy. Hlavním produktem metabolické přeměny PNP je NB [46], kterému se tato práce také věnuje.

V současné době jsou vyvinuty ke stanovení PNP chromatografické [47] i elektrochemické metody [48, 49].

Nitrobenzen

Za laboratorních podmínek je NB kapalný, žluté barvy. Zapáchá po hořkých mandlích a je omezeně rozpustný ve vodě [46, 50]. Dle IARC [51] je NB zařazen ve skupině 2B.

Studovaná látka je průmyslově významná, používá se k výrobě anilinu (ten se dále uplatňuje v barvicím průmyslu), jako rozpouštědlo při rafinaci ropy a k výrobě benzidinu a chinolinu, které se dále zpracovávají k přípravě izokyanátů, pesticidů a léčiv. Nitrobenzen se vyskytuje v atmosféře, do které se zřejmě dostává odpařováním z vod a půd [50]. Pozornost je věnována možnostem jeho odstranění z vod [52, 53].

K analýze NB v životním prostředí se využívají chromatografické metody, především plynová chromatografie [17, 46, 54]. Elektrochemickým stanovením NB voltametrickými metodami se zabývá množství prací, např. Ni a kol. [55], Li a kol. [56], Kippaxdavis a kol. [57].

1.3.5 Deoxyribonukleová kyselina

DNA z lososího sperma, která byla použita k experimentům, má za laboratorních podmínek formu světle žlutého prášku a je omezeně rozpustná ve vodě (do koncentrace $10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$) [58]. V dodávaném materiálu převládá *dsDNA*.

V roce 1869 byla DNA poprvé izolována švýcarským vědcem J. F. Miescherem, a to z lidských bílých krvinek. Roku 1946 byla zjištěna funkce DNA [59] – přenos genetické informace a o dalších 7 let později J. D. Watson a F. Crieck uveřejnili trojrozměrný model DNA - dvoušroubovici [60].

Nukleové kyseliny jsou nositelem genetické informace. Strukturně to jsou polymery nukleotidů. Nukleotid je složen z báze, cukerného zbytku a fosfátového zbytku. Fosfáty vytvářejí můstky mezi polohami 3' a 5' po sobě následujících cukerných zbytků. V *dsDNA* jsou řetězce spojeny vodíkovými můstky mezi bazemi. Jejich párování se řídí tzv. komplementaritou bazí - cytosin vytváří vodíkové můstky s guaninem a adenin s uracilem. [61]

K poškození DNA může docházet vlivem fyzikálních a chemických činitelů. K fyzikálním faktorům patří např. teplota, pH, UV a ionizující záření, k chemickým patří kovalentní a nekovalentní interakce s xenobiotiky, produkty metabolické přeměny atp. Během jedné hodiny se lidská DNA v buňce potýká průměrně s celkovým počtem 800

poškození. Pokud tyto změny v DNA nejsou opraveny, dochází např. k mutaci a poté k nekontrolovanému růstu buněk [62].

1.4 Použité elektrody

1.4.1 HMDE

Visící rtuťová kapková elektroda je vhodná pro měření, u kterých není zřejmé, zda jejich výsledky budou na robustnějších elektrodách (v této práci na m-AgSAE) reprodukovatelné nebo spolehlivé. Výhodou této elektrody je vysoké přepětí vodíku a dobrá opakovatelnost měření – na konci a začátku každého měření je povrch elektrody obnoven odkápnutím rtuťové kapky, což eliminuje většinu problémů s její pasivací

1.4.2 m-AgSAE

Rtuťovým meniskem modifikovaná stříbrná pevná amalgamová elektroda je vhodnou robustnější alternativou k HMDE. Elektroda je tvořena platinovým drátkem, který je umístěn ve skleněné kapiláře. Na konci této kapiláry je stříbrným leštěný amalgám a na jeho povrchu, ve styku s analyzovaným roztokem, rtuťový meniskus [63]. Vlastnosti m-AgSAE jsou velmi podobné vlastnostem HMDE [64].

Tato elektroda se osvědčila pro voltametrické analýzy environmentálních polutantů a karcinogenních látek [65-67] a pro měření v průtoku jako pracovní elektroda amperometrických detektorů [68].

Výhodou této elektrody je, jak bylo uvedeno výše, její robustnost a vysoké přepětí vodíku, díky němuž je vhodná pro sledování redukčních procesů.

Povrch elektrody je upravován dle standardních postupů [69] sestávajících ze tří kroků: amalgamace, elektrochemická aktivace, regenerace.

Amalgamace: Elektroda je při tomto procesu přibližně na 10 s ponořena do kapalné rtuti a pomalu vyjmuta, čímž se vytvoří meniskus. Velikost menisku, která je po každé amalgamacii trochu jiná, může negativně ovlivnit reprodukovatelnost výsledků měření. Amalgamace je prováděna při pasivaci povrchu elektrody nebo po dlouhodobém přerušení práce.

Elektrochemická aktivace: Tento krok je zařazen po aktivaci a po krátkodobém přerušení práce. Elektroda je během elektrochemické aktivace ponořena do roztoku KCl ($c = 0,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) a po dobu 300 s je na ni vloženo napětí -2200 mV , roztokem je současně mícháno.

Tímto krokem se elektroda elektrochemicky čistí, dochází k odstranění oxidů a látek adsorbovaných na povrch rtuťového menisku.

Regenerace: Tato operace se provádí v měřeném roztoku vždy před začátkem měření. Během regenerace se skokově střídá konstantní potenciálu $E_{\text{reg},1}$ a konstantní potenciál $E_{\text{reg},2}$. Tyto potenciály jsou vkládány v intervalu 0,1 s po dobu 30 s. Hodnoty potenciálů $E_{\text{reg},1}$ a $E_{\text{reg},2}$ zpravidla odpovídají krajům potenciálového okna (při absolutní velikosti registrovaného proudu větší než $I = 1 \text{ } \mu\text{A}$) obecně je však nutné nalézt optimální potenciály regenerace experimentálně. Hodnota $E_{\text{reg},1}$ obvykle odpovídá hodnotě kladnějšího kraje potenciálového okna snižené o 100 mV, hodnota $E_{\text{reg},2}$ odpovídá obvykle hodnotě zápornějšího kraje potenciálového okna zvýšené o 100 mV.

1.5 Asociace DNA s nízkomolekulárními látkami

K asociaci DNA s nízkomolekulárními látkami může docházet třemi různými způsoby:

1) *Interkalace planární aromatické molekuly mezi páry bazí DNA*

Dochází k odčerpání elektronů z nitroskupiny, což vede ke stabilizaci aromatického kruhu a k usnadnění její redukce (redukční potenciál se posouvá ke kladným hodnotám). Nedochází ke vzniku kovalentní vazby, ale může vznikat několik nekovalentních interakcí. Následkem jsou charakteristické změny ve struktuře *dsDNA* - odvinutí dvoušroubovice.

2) *Vazba do velkého a malého žlábků dvouvláknové struktury DNA*

Při tomto typu interakce vznikají adukty DNA s nitroskupinami a půlvlnový potenciál studované látky se může posouvat ke kladným i záporným hodnotám.

3) *Elektrostatické interakce kladně nabitých hostujících molekul se záporně nabitými fosfátovými skupinami DNA*

Tento typ interakce je typický pro planární sloučeniny, které obsahují tři až čtyři aromatické kruhy. Studovaná látka z cukr-fosfátového zbytku odčerpává elektrony, čímž se

stává obtížněji redukovatelnou a její půlvlnový potenciál se posouvá k záporným hodnotám.

Změnou reakčních podmínek se typy interakcí mohou kombinovat. Jako příklad lze uvést změnu iontové síly roztoku, uvažujeme-li interakci *dsDNA*. Při nízké iontové síle je při interakci s kladně nabitými kovovými komplexy obsahujícími aromatické ligandy dominantní elektrostatická interakce, při vyšší hodnotě iontové síly převažuje interkalace [70].

Jelikož vybrané studované látky mohou s DNA interagovat různě, i posuny jejich půlvlnových potenciálů se mohou lišit. Toho by mělo jít využít k analýze směsi látek. Půlvlnový potenciál látky A může být po interakci s DNA posunut k záporným hodnotám, zatímco potenciál látky B ke kladným. Tímto by bylo možné snížit mez detekce simultánního stanovení dvou látek, jejichž píky se při DP voltametrické analýze překrývají.

1.6 Voltametrické stanovení směsi

K voltametrické analýze směsi se využívá technika DPV. Oproti technice DCV lze dosáhnout nižších mezí stanovitelnosti a lze vedle sebe stanovit i látky, jejichž půlvlnové potenciály se méně liší.

Elektrochemické metody simultánního stanovení se vyvíjejí především pro látky, jejichž rozdíl půlvlnových potenciálů je malý a které se vyskytují v analyzovaných vzorcích současně. Jde o různé deriváty – např. nitrobenzen a nitrované fenoly [55], 2-nitrofenol a 4-nitrofenol [71], léčiva a jejich metabolity – analgetikum paracetamol a *p*-aminofenol [72], anestetikum prokain a *p*-aminobenzoová kyselina [73], a hnojiva a pesticidy a produkty jejich přeměny [74].

Pro analýzu směsí jsou vhodné pracovní elektrody uhlíkové (skelný uhlík, grafitová pasta) a rtuťové. Použití m-AgSAE se nabízí jako robustnější a méně pracovně náročná alternativa ke rtuťovým elektrodám.

Voltamogramy směsí lze vyhodnotit s využitím množství chemometrických metod – např. faktorová analýza ITTFA (Iterative Target Transformation Factor Analysis) [75, 76], regresní analýza hlavních komponent (PCR), lineární kvadratická estimace (LQE), a další [55, 71]

Nejobvyklejším způsobem vyhodnocení je odečtením výšky píku od spojnice krajních minim obou píků [72, 73].

2 EXPERIMENTÁLNÍ ČÁST

2.1 Reagencie

Zásobní roztoky 4-NBP, 2-NBP, 3-NBP (všechny 99%, Merck), NB a PNP (oba $\geq 99,5\%$, Sigma-Aldrich) o koncentraci $1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ byly připraveny rozpuštěním příslušného množství čisté látky ve 100 ml methanolu nebo ethanolu (oba p.a., Merck). Roztoky o nižší koncentraci byly připraveny přesným ředěním zásobního roztoku methanolem nebo ethanolem.

Všechny roztoky byly skladovány ve skleněných nádobách, ve tmě a za laboratorní teploty.

Další použité chemikálie: DNA z lososího sperma (Sigma-Aldrich, Japonsko) byla skladována při teplotě 4°C , tris(hydroxymethyl)aminomethan hydrochloridu (Tris-HCl, p.a., Sigma-Aldrich, ČR); octová kyselina (CH_3COOH), hydroxid sodný (NaOH) – oba p.a., Lach-Ner, ČR), trihydrát octanu sodného ($\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$), monohydrát dihydrogenfosforečnanu sodného ($\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$), heptahydrát hydrogenfosforečnanu sodného ($\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$), kyselina boritá (H_3BO_3), kyselina fosforečná (H_3PO_4) – všechny p.a., Chemapol, ČR; kyselina chlorovodíková (HCl, 35%), ethylendiamintetraoctová kyselina (EDTA) – oboje p.a., Penta, ČR.

Brittonův-Robinsonův pufr (BR pufr) o příslušném pH byl připraven smísením kyselé složky (směs H_3BO_3 , CH_3COOH a H_3PO_4 , všechny $0,04 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) a zásadité složky ($0,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ NaOH). Zásadité složka měla pH 13,3 a pH kyselé složky bylo 2,1.

Fosfátový pufr (PB) 1) o pH 7,0 a koncentraci $c = 0,025 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ byl připraven rozpuštěním 2,92 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ a 7,74 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ ve 2000 ml deionizované vody. 2) o pH 6,0 a koncentraci $c = 0,25 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ byl připraven rozpuštěním 7,60 g $\text{NaH}_2\text{PO}_4 \cdot \text{H}_2\text{O}$ a 4,09 g $\text{Na}_2\text{HPO}_4 \cdot 7 \text{H}_2\text{O}$ v 250 ml deionizované vody.

Acetátový pufr (AB) 1) o pH 4,8 a $c = 0,25 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ byl připraven rozpuštěním 4,25 g $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ a z 1,77 ml CH_3COOH v 250 ml deionizované vody. 2) o pH 6,0 a $c = 0,10 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ byl připraven z 3,40 g $\text{CH}_3\text{COONa} \cdot 3\text{H}_2\text{O}$ a z 1,94 ml CH_3COOH a 250 ml deionizované vody.

Roztok DNA byl připraven rozpuštěním DNA v příslušném rozpouštědle, aby výsledná koncentrace DNA byla $c_{\text{DNA}} = 10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. Jako rozpouštědla byla používána deionizovaná voda, roztok EDTA/Tris-HCl, roztok Tris-HCl ($0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) a roztok EDTA ($1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$).

Roztok EDTA/Tris-HCl byl připraven rozpuštěním 0,315 g Tris-HCl a 0,058 g EDTA ve 200 ml deionizované vody. Koncentrace EDTA ve výsledném roztoku byla $1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ a koncentrace Tris-HCl byla $0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Výsledný roztok byl upraven přidávkem NaOH ($0,2 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), aby jeho výsledné pH bylo 7,0. Analogicky byl připraven $1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ roztok EDTA a $10 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$ roztok Tris-HCl.

Stálost zásobních roztoků 4-NBP a 2-NBP byla prověřena spektrofotometrickým měření absorbance v jejich maximu po dobu 60 dní.

2.2 Aparatura

Všechna voltmetrická měření byla provedena s použitím soustavy Eco-Tribo Polarograf se softwarem PolarPro 5.1 (obojí Polaro-Sensors, Praha). Software byl nainstalován v operačním systému Windows XP Professional (Microsoft Corporation, Remond, USA).

Měření byla prováděna v tříelektrodovém zapojení. Jako pracovní elektroda byla použita rtuťovým meniskem modifikovaná stříbrná pevná amalgamová elektroda (m-AgSAE) nebo visící rtuťová kapková elektroda (HMDE), jako referentní elektroda byla použita nasycená argentchloridová ($c_{\text{KCl}} = 0,1 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, Monokrystaly, Turnov), k níž jsou vztaženy všechny naměřené hodnoty potenciálů, a jako pomocná elektroda byla použita platinová drátková elektroda.

V tab. 2.1 jsou shrnuty parametry použitých metod:

Tabulka 2.1 Parametry použitých metod DCV, DPV a AdSDPV.

Metoda	rychlost nárůstu potenciálu [$\text{mV} \cdot \text{s}^{-1}$]	šířka pulzu [ms]	modulační amplituda [mV]
DCV	20	-	-
DPV	20	100	-50
AdSDPV	20	100	-50

Ke spektrofotometrickým měřením byl použit přístroj Agilent 8453 (Agilent Technologies) se softwarem UV-Visible ChemStation, ver. 9.01, software pracoval v operačním systému Windows Millenium (Microsoft Corporation, Remond, USA). Měření byla prováděna v křemenných kyvetách tloušťky 1 cm a 1 mm.

Měření pH roztoků bylo prováděno digitálním pH-metrem Jenway 4330 (Jenway, Velká Británie) s kombinovanou skleněnou elektrodou, kalibrovaným standardními vodnými kalibračními roztoky pufrů.

2.3 Použité pracovní elektrody

2.3.1 HMDE

Parametry použité HMDE byly následující:

doba otevření ventilu pro vytvoření kapky: 400 ms

průměr kapiláry: 0,135 mm

povrch kapky: $0,57 \pm 0,02$ (3,51%) mm²

Použití HMDE:

- 1) Studium mechanismu elektrochemické redukce 4-NBP a 2-NBP.
- 2) Studium interakce 4-NBP a 2-NBP s DNA a s ním související měření.

Povrch kapky byl vypočten z gravimetrických měření: do roztoku KCl ($c = 3 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) bylo odkápnuto 20 kapek při nulovém vloženém napětí proti používané argentchloridové elektrodě. Hmotnost 20 kapek byla určena z rozdílu před přidáním a po přidání 20 kapek. Měření bylo provedeno tři krát a při výpočtu byl předpokládán kulový tvar kapky.

2.3.2 m-AgSAE

Kraje potenciálového okna a optimální hodnoty regeneračních potenciálů $E_{\text{reg},1}$ a $E_{\text{reg},2}$ byly nalezeny experimentálně.

Použití m-AgSAE:

- 1) Stanovení 4-NBP v modelových vzorcích říční vody metodami DCV a DPV a studium využití AdSDPV ke stanovení 4-NBP.
- 2) Studium elektrochemického chování 2-NBP, nalezení optimálních podmínek jeho stanovení, ověření vyvinutých metod ke stanovení 2-NBP v modelových vzorcích pitné a říční vody. Studium využití metody AdSDPV ke stanovení 2-NBP.
- 3) Simultánní stanovení 4-NBP a 2-NBP.
- 4) Studium mechanismu elektrochemické redukce 4-NBP a 2-NBP.

2.4 Pracovní postupy

Do odměrné baňky o objemu 10 ml bylo odpipetováno příslušné množství zásobního roztoku studované látky (všechny $c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), potřebné množství methanolu nebo ethanolu, a roztok byl doplněn vodným pufrům o daném pH po rysku. Poměr vodné a organické složky byl volen tak, aby stálost roztoku byla co nejvyšší.

Roztok byl promíchán, převeden do voltametrické nádoby a zbaven kyslíku pětiminutovým probubláváním dusíkem. Poté byly zaznamenány voltametrické křivky, každá křivka byla změřena třikrát.

Při simultánním stanovení směsi 4-NBP a 2-NBP byla volena koncentrace 2-NBP konstantní (roztok byl připraven standardním postupem) a roztok 4-NBP byl přidáván do požadované výsledné koncentrace.

Obdobný byl postup při proměřování vlivu přítomnosti *ds*DNA na elektrochemické chování studovaných látek. Ke standardně připravenému roztoku studované látky byl přidáván roztok DNA o koncentraci $10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$. V tab. 2.2 jsou uvedeny výsledné koncentrace DNA ($c_{\text{DNA}, \text{v}}$) v měřeném roztoku podle objemu přídatku (V_{DNA}).

Tabulka 2.2

Výsledná koncentrace DNA ($c_{\text{DNA}, \text{v}}$) v měřeném roztoku o původním objemu 10 ml odpovídající objemu přídatku (V_{DNA}) zásobního roztoku DNA ($c_{\text{DNA}} = 10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$).

V_{DNA} [μl]	$c_{\text{DNA}, \text{v}}$ [$\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$]	V_{DNA} [μl]	$c_{\text{DNA}, \text{v}}$ [$\mu\text{g} \cdot \text{ml}^{-1}$]
0	0,00	200	196,08
2	2,00	500	476,19
5	5,00	1000	909,09
10	9,99	1500	1304,35
20	19,96	2000	1666,67
50	49,75	2500	2000,00
100	99,01		

2.5 Zpracování výsledků a statistické vyhodnocení získaných dat

Výšky píků získané technikou DCV byly měřeny od přímky vzniklé prodloužením lineární části voltamogramu před nástupem vlny. Výšky píků získané technikou DPV byly vyhodnoceny od spojnice minim po jeho stranách.

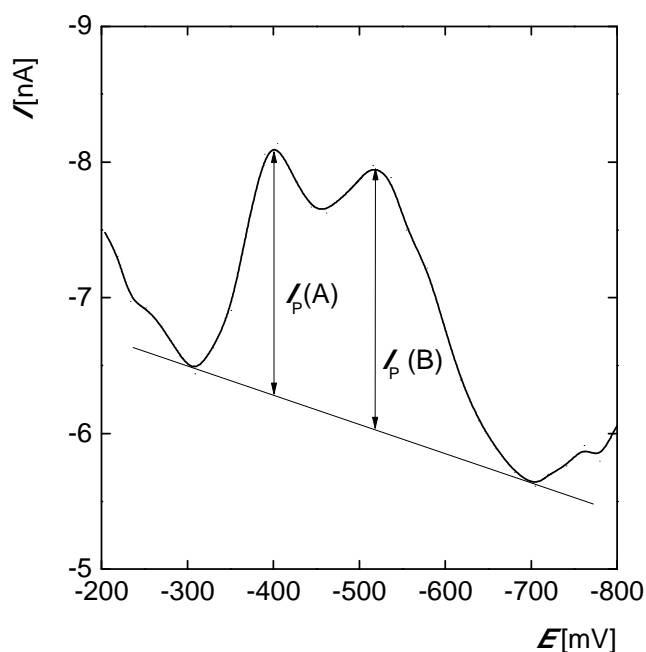
Výšky píků jednotlivých složek směsi měřené technikou DPV byly vyhodnoceny od spojnice začátku prvního a konce druhého píku (viz obr. 1.1).

K provedení potřebných výpočtů, sestrojení grafů a zpracování získaných dat byly využity programy OriginPro 8 (OriginLab Corporation, Northampton, USA) a Microsoft Office Excel 2007 (Microsoft Corporation, Remond, USA), oba pracující v systému Windows 7 (Microsoft Corporation, Remond, USA).

Predikční pásy a konfidenční pásy (na hladině významnosti 0,05) kalibračních přímek byly sestrojeny pomocí programu OriginPro 8.

Statistické vyhodnocení opakovatelnosti voltametrických měření na m-AgSAE bylo provedeno dle zavedených chemometrických norem pro tento typ souboru dat [77].

Mez stanovitelnosti (LOD) byla vypočtena jako desetinásobek směrodatné odchylky deseti měření o koncentraci odpovídající nejnižšímu bodu příslušné kalibrační přímky [77].



Obr. 1.1 Modelový způsob vyhodnocení DP voltamogramu směsi látek A a B. $I_p(A)$ - proud látky A, $I_p(B)$ – proud látky B.

3 VÝSLEDKY A DISKUZE

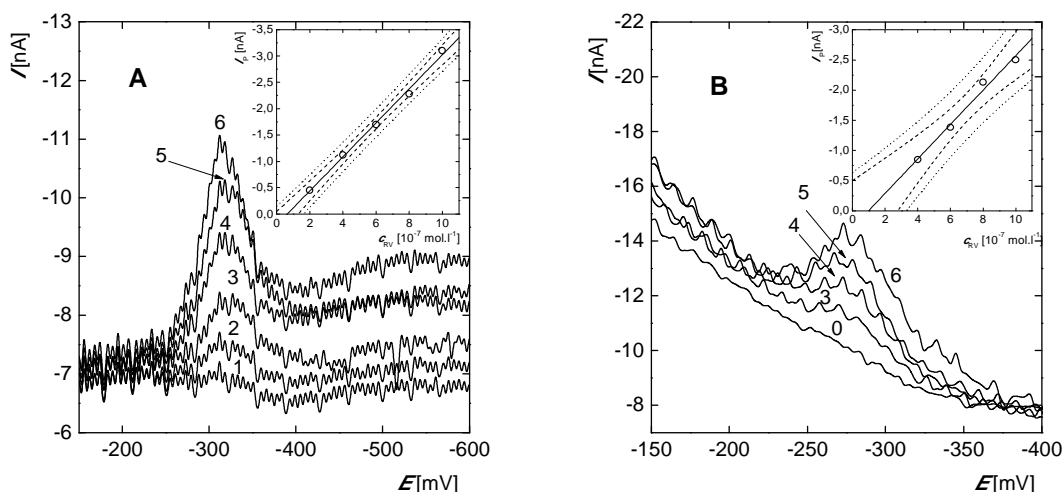
3.1 Voltametrické stanovení 4-nitrobifenylu

3.1.1 Voltametrické stanovení 4-NBP v modelových vzorcích říční vody

Koncentrační závislost stanovení 2-NBP v modelových vzorcích říční vody byla proměřena metodami DCV a DPV na m-AgSAE v koncentračním rozmezí $(2-10) \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Říční voda byla odebrána z Vltavy v Praze a nebyla před analýzami nijak upravena.

Modelové roztoky o koncentracích 4-NBP v říční vodě $c_{\text{RV}}(4\text{-NBP})$: 0; $1 \cdot 10^{-7}$; $2 \cdot 10^{-7}$; $4 \cdot 10^{-7}$; $6 \cdot 10^{-7}$; $8 \cdot 10^{-7}$ a $10 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ byly připraveny ze zásobního roztoku 4-NBP ($c = 1 \cdot 10^{-3} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) v methanolu a z říční vody. Z připravených modelových vzorků 4-NBP bylo odpipetováno 9 ml do odměrné baňky o objemu 10 ml a doplněno acetátovým pufrům (pH 4,8) po značku. Každá křivka byla změřena třikrát.

Parametry kalibračních přímek a dosažené meze stanovitelnosti jsou uvedeny v tab. 3.1. Na obr. 3.1 jsou zaznamenány voltamogramy 4-NBP v prostředí říční voda-0,25 $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ acetátový pufr pH 4,8 (9:1) naměřené metodami DCV a DPV na m-AgSAE.



Obr. 3.1 Voltamogramy 4-NBP naměřené metodou DCV (A) bez regenerace a metodou DPV (B) s regenerací ($E_{\text{reg},1} = 0 \text{ mV}$, $E_{\text{reg},2} = -1300 \text{ mV}$) na m-AgSAE v prostředí říční voda-acetátový pufr pH 4,8 (9:1). $c_{\text{RV}}(4\text{-NBP})$: 0 (1); $2 \cdot 10^{-7}$ (2); $4 \cdot 10^{-7}$ (3); $6 \cdot 10^{-7}$ (4); $8 \cdot 10^{-7}$ (5) a $10 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Vloženy závislosti proudu píků (I_p) 4-NBP na koncentraci v říční vodě v rozmezí $(2-10) \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$; - - - konfidenční pás; predikční pás.

Tab. 3.1 Parametry kalibračních přímk stanovení 4-NBP na m-AgSAE v říční vodě a dosažené meze stanovitelnosti (*LOD*).

Metoda	prostředí	koncentrace [mol·l ⁻¹]	směrnice [mA·mol ⁻¹ ·l]	úsek [nA]	<i>R</i> ²	<i>LOD</i> [mol·l ⁻¹]
DCV	říční voda – acetátový pufr pH 4,8 (9:1)	(2–10)·10 ⁻⁷	–3,2	0,25	0,9943	2·10 ⁻⁷
DPV	říční voda – acetátový pufr pH 4,8 (9:1)	(2–10)·10 ⁻⁷	–2,9	0,31	0,9866	4·10 ⁻⁷

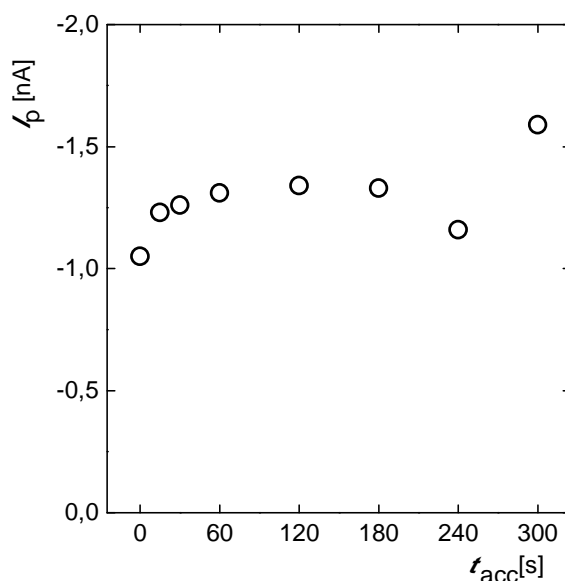
3.1.2 Adsorpční rozpouštěcí diferenční pulzní voltametrie 4-NBP

Ke snížení limitu detekce 4-NBP metodou DPV na m-AgSAE byla prověřena možnost využití techniky AdSDPV.

Na základě výsledků optimalizace měření [1] byla použita při každém měření regenerace ($E_{\text{reg},1}$ a $E_{\text{reg},2}$ dle krajů potenciálového okna). Měření byla provedena ve směsném prostředí MeOH-pufr v objemovém poměru 1:9. Dále bylo měřeno v objemovém poměru MeOH-pufr 1:249, a to za účelem snížení obsahu MeOH, který může snižovat adsorpci 4-NBP na povrch elektrody.

Vliv pH na voltametrické chování 4-NBP ($c = 4 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) byl studován v prostředí BR pufru o pH 2,0 a pH 13,0, acetátového pufru o pH 4,8 a fosfátového pufru o pH 7,0. Hodnota potenciálu akumulace (E_{acc}) byla volena jako potenciál píku (E_p) a dále jako $E_p + (100\text{--}300) \text{ mV}$, doba akumulace (t_{acc}) byla 60 s.

Pouze v prostředí MeOH-BR pufr pH 2,0 (1:9), při $E_{\text{acc}} = -400 \text{ mV}$ a $t_{\text{acc}} = 300 \text{ s}$ (obr. 3.2) se projevil efekt akumulace 4-NBP na m-AgSAE. Došlo ke zvětšení signálu přibližně 1,5 krát vůči výšce píku při $t_{\text{acc}} = 0 \text{ s}$.



Obr 3.2 Závislost proudu píku I_p na době akumulace t_{acc} . Měřeno technikou AdSDPV s regenerací na m-AgSAE v prostředí methanol-BR pufr pH 2,1 (1:9), $c(4\text{-NBP}) = 4 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. $E_{reg,1} = 300 \text{ mV}$, $E_{reg,2} = -1100 \text{ mV}$, $E_{acc} = -400 \text{ mV}$.

Míra akumulace 4-NBP na m-AgSAE při měření technikou AdSDPV za výše uvedených podmínek nebyla dostatečná k tomu, aby bylo možné její další využití ke snížení limitu detekce.

Pro stanovení 4-NBP metodou AdSDPV na m-AgSAE nebyly nalezeny vhodné podmínky.

3.2 Voltametrické stanovení 2-nitrobifenylu

3.2.1 Optimalizace podmínek měření

Vliv obsahu methanolu na stálost měřeného roztoku byl sledován spektrofotometricky a voltametricky na m-AgSAE. Byly testovány poměry objemů MeOH a BR pufru 1:1, 3:7, 2:8 a 1:9. Byla použita vždy zvlášť kyselá a zásaditá složka BR pufru, koncentrace 2-NBP v těchto roztocích byla $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Bylo zjištěno, že na stabilitu a velikost odezvy má vliv obsah methanolu v základním elektrolytu. Z hlediska stálosti měřeného roztoku byl jako optimální vybrán poměr MeOH-BR pufru 1:9.

Vliv pH na elektrochemické chování 2-NBP ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) metodami DCV a DPV na m-AgSAE byl sledován v prostředí BR pufru o pH 2,1 až 12,0 a poměru methanol-BR pufr 1:9.

DPV voltamogramy 2-NBP ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) naměřené při různém výsledném pH* (pH roztoku vzniklého smísením methanolu a BR pufru o daném pH) jsou na obr. 3.3.

Pro metodu DCV byl metodou lineární regrese pro závislost potenciálu píku E_p 4-NBP na pH* roztoku v rozmezí 2,2–7,0 vypočten vztah:

$$E_p [\text{mV}] = -54,08 \text{ pH}^* - 196,06 \quad (R^2 = 0,9996);$$

a v rozmezí 7,0 – 13,0:

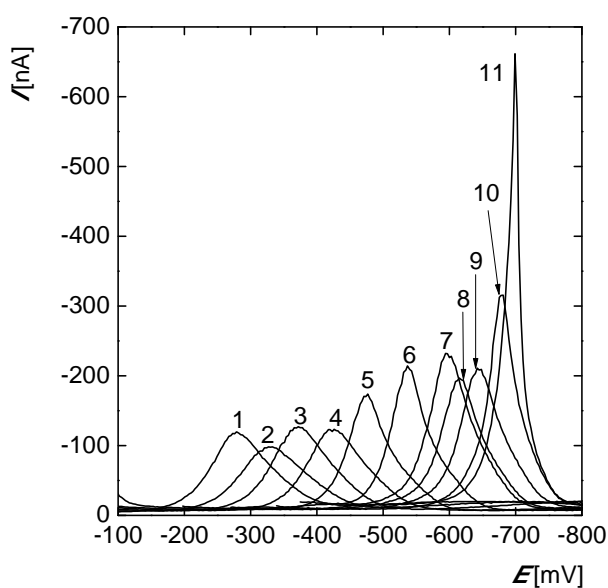
$$E_p [\text{mV}] = -19,96 \text{ pH}^* - 481,04 \quad (R^2 = 0,9567).$$

Pro metodu DPV byl metodou lineární regrese pro závislost potenciálu píku E_p 4-NBP na pH* roztoku v rozmezí 2,2 – 7,0 vypočten vztah:

$$E_p [\text{mV}] = -54,98 \text{ pH}^* - 140,52 \quad (R^2 = 0,9986);$$

a v rozmezí 7,0–13,0:

$$E_p [\text{mV}] = -20,87 \text{ pH}^* - 421,45 \quad (R^2 = 0,9937).$$



Obr. 3.3 Voltamogramy 2-NBP ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) naměřené DPV s regenerací na m-AgSAE v prostředí MeOH–BR pufr (1:9) o pH* 2,2 (1); 3,2 (2); 4,1 (3); 5,1 (4); 6,3 (5); 7,3 (6); 8,2 (7); 9,2 (10,1); 10,1 (9); 11,2 (10); 12,0 (11). $E_{\text{reg},1}$, $E_{\text{reg},2}$ dle krajů potenciálového okna.

Jako optimální pro další měření bylo vybráno prostředí o pH 12, pro zjednodušení byl BR pufr nahrazen $0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ hydroxidem lithným.

Dále byla testována potřeba aplikace regenerace. Za daných podmínek bylo provedeno vždy 20 měření a spočítána relativní směrodatná odchylka (*RSD*).

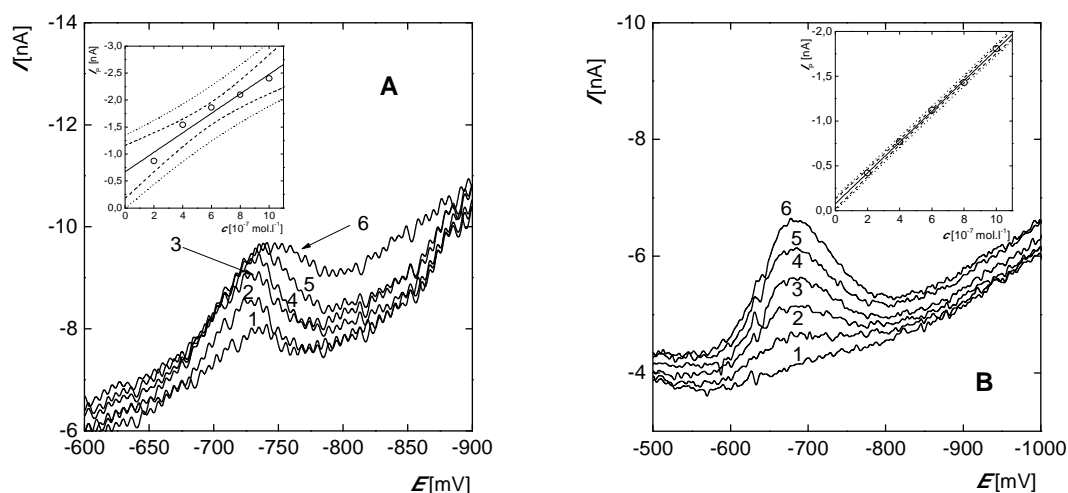
Pro měření 2-NBP ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) v prostředí MeOH– $0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ LiOH (1:9) metodou DCV byla *RSD* měření bez regenerace 1,7 % a pro měření s regenerací 3,8 % ($E_{\text{reg},1}$, $E_{\text{reg},2}$ dle krajů potenciálového okna). Po několika pokusech, při nichž byly regenerační potenciály voleny na krajích píku a krajích okna a použity jejich různé kombinace, byly jako optimální vybrány regenerační potenciály $E_{\text{reg},1} = -500 \text{ mV}$, $E_{\text{reg},2} = -1700 \text{ mV}$.

K měření 2-NBP ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) v prostředí MeOH– $0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ LiOH (1:9) metodou DPV je vhodné aplikovat regeneraci $E_{\text{reg},1} = 0 \text{ mV}$, $E_{\text{reg},2} = -1800 \text{ mV}$, *RSD* těchto měření byla 1,2 %, pro měření bez regenerace byla *RSD* 1,9 %.

Na základě výše uvedených skutečností bylo jako optimální pro obě techniky zvoleno prostředí MeOH– $0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ LiOH (1:9) a aplikace regenerace (DCV: $E_{\text{reg},1} = -500 \text{ mV}$, $E_{\text{reg},2} = -1700 \text{ mV}$; DPV: $E_{\text{reg},1} = 0 \text{ mV}$, $E_{\text{reg},2} = -1800 \text{ mV}$).

3.2.2 Koncentrační závislost

Závislosti proudu píku (I_p) 2-NBP na koncentraci byly proměřeny metodami DCV (s regenerací, $E_{\text{reg},1} = -500 \text{ mV}$, $E_{\text{reg},2} = -1700 \text{ mV}$) a DPV (s regenerací, $E_{\text{reg},1} = 0 \text{ mV}$, $E_{\text{reg},2} = -1800 \text{ mV}$) na m-AgSAE v prostředí MeOH– $0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ LiOH (1:9) v koncentračním rozmezí $(2-10) \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$, $(2-10) \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a $(2-10) \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Na obr. 3.4 jsou zaznamenány voltamogramy 2-NBP v pitné vodě naměřené metodou DCV (A) s regenerací ($E_{\text{reg},1} = -500 \text{ mV}$, $E_{\text{reg},2} = -1700 \text{ mV}$) a DPV (B) s regenerací ($E_{\text{reg},1} = -0 \text{ mV}$, $E_{\text{reg},2} = -1800 \text{ mV}$) na m-AgSAE.



Obr. 3.4 Voltamogramy 2-NBP naměřené metodou DCV (A) s regenerací ($E_{\text{reg},1} = -500$ mV, $E_{\text{reg},2} = -1700$ mV) a DPV (B) s regenerací ($E_{\text{reg},1} = -0$ mV, $E_{\text{reg},2} = -1800$ mV) na m-AgSAE v prostředí MeOH-0,01 mol·l⁻¹ LiOH (1:9). c (2-NBP): 0 (1); $2 \cdot 10^{-7}$ (2); $4 \cdot 10^{-7}$ (3); $6 \cdot 10^{-7}$ (4); $8 \cdot 10^{-7}$ (5) a $10 \cdot 10^{-7}$ (6) mol·l⁻¹. Vložena závislost proudu píků I_p 2-NBP na koncentraci v rozmezí $(2-10) \cdot 10^{-7}$ mol·l⁻¹. $E_{\text{reg},1} = 0$ mV, $E_{\text{reg},2} = -1800$ mV; - - - konfidenční pás; predikční pás.

Pro všechny koncentrační řady má závislost výšky píku na koncentraci lineární charakter.

V prostředí MeOH-0,01 mol·l⁻¹ LiOH bylo na m-AgSAE metodou DCV s regenerací ($E_{\text{reg},1} = -500$ mV, $E_{\text{reg},2} = -1700$ mV) dosaženo meze stanovitelnosti 2-NBP $2 \cdot 10^{-7}$ mol·l⁻¹ a metodou DPV s regenerací ($E_{\text{reg},1} = 0$ mV, $E_{\text{reg},2} = -1800$ mV) $1 \cdot 10^{-7}$ mol·l⁻¹. Parametry kalibračních přímků a dosažené meze stanovitelnosti jsou uvedeny v tab. 3.2.

3.2.3 Voltametrické stanovení 2-NBP v modelových vzorcích vody

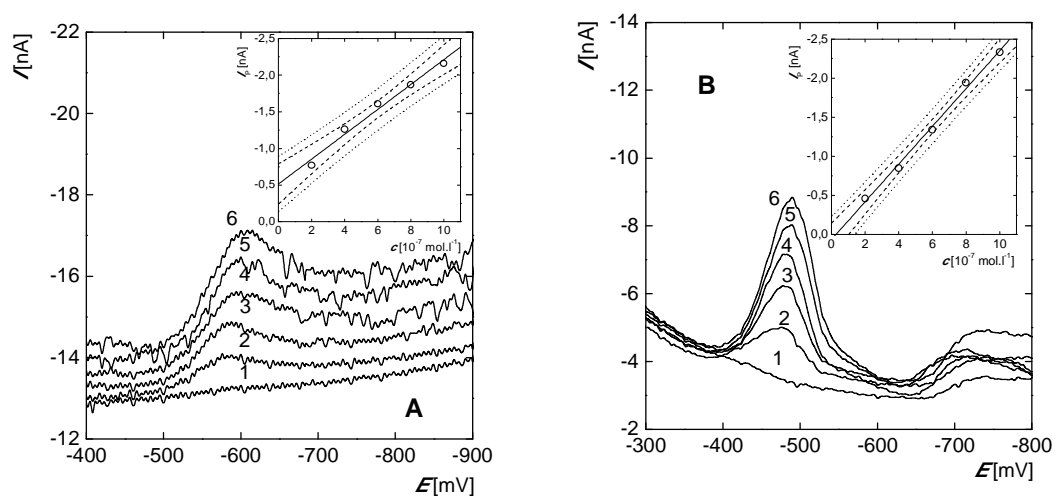
Koncentrační závislost stanovení 2-NBP v modelových vzorcích vody byla proměřena metodami DCV a DPV na m-AgSAE v koncentračním rozmezí $(2-10) \cdot 10^{-7}$ mol·l⁻¹. Říční voda byla odebrána z Vltavy v Praze, pitná ani říční voda nebyly před analýzami nijak upraveny.

Modelové roztoky o koncentracích c_V/c_{RV} (2-NBP): 0; $1 \cdot 10^{-7}$; $2 \cdot 10^{-7}$; $4 \cdot 10^{-7}$; $6 \cdot 10^{-7}$; $8 \cdot 10^{-7}$ a $10 \cdot 10^{-7}$ mol·l⁻¹ byly připraveny ze zásobního roztoku 2-NBP ($c = 1 \cdot 10^{-3}$ mol·l⁻¹)

v methanolu a vody. Z připravených modelových vzorků 2-NBP bylo odpipetováno 9 ml do odměrné baňky o objemu 10 ml a doplněno roztokem $0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ LiOH.

Stanovení 2-NBP v modelových vzorcích pitné vody

Na obr. 3.5 jsou zaznamenány voltamogramy 2-NBP v pitné vodě naměřené metodou DCV (A) s regenerací ($E_{\text{reg},1} = -500 \text{ mV}$, $E_{\text{reg},2} = -1700 \text{ mV}$) a DPV (B) s regenerací ($E_{\text{reg},1} = -0 \text{ mV}$, $E_{\text{reg},2} = -1800 \text{ mV}$).



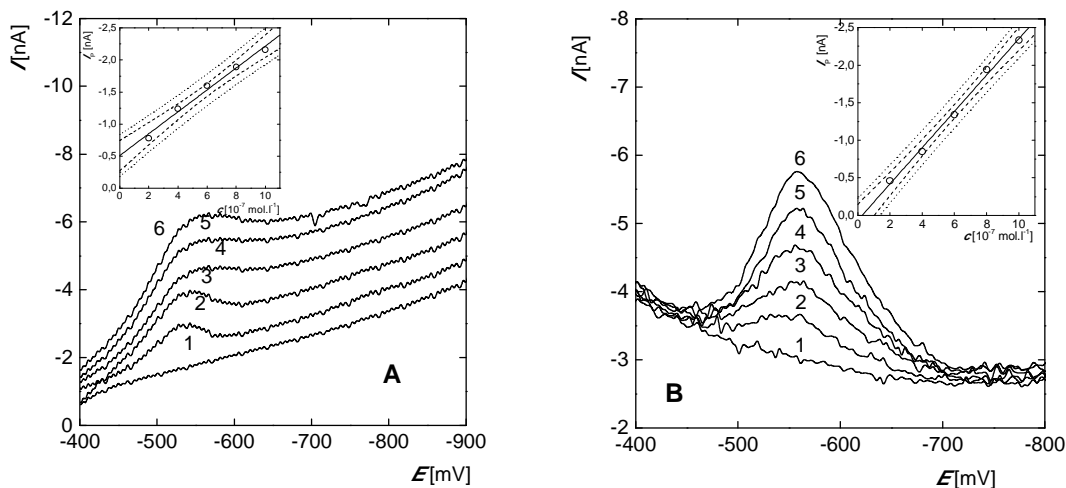
Obr. 3.5 Voltamogramy 2-NBP naměřené metodou DCV (A) s regenerací ($E_{\text{reg},1} = -500 \text{ mV}$, $E_{\text{reg},2} = -1700 \text{ mV}$) a DPV (B) s regenerací ($E_{\text{reg},1} = -0 \text{ mV}$, $E_{\text{reg},2} = -1800 \text{ mV}$) na m-AgSAE v prostředí $0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ LiOH-pitná voda (1:9). c (2-NBP): 0 (1); $2 \cdot 10^{-7}$ (2); $4 \cdot 10^{-7}$ (3); $6 \cdot 10^{-7}$ (4); $8 \cdot 10^{-7}$ (5) a $10 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Vloženy závislosti proudu píků I_p 2-NBP na koncentraci v rozmezí $(2-10) \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$; - - - konfidenční pás; predikční pás.

Pro všechny koncentrační řady má závislost výšky píku na koncentraci lineární charakter.

Na m-AgSAE bylo v modelových vzorcích pitné vody metodou DCV s regenerací ($E_{\text{reg},1} = -500 \text{ mV}$, $E_{\text{reg},2} = -1700 \text{ mV}$) dosaženo meze stanovitelnosti 2-NBP $2 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a metodou DPV s regenerací ($E_{\text{reg},1} = 0 \text{ mV}$, $E_{\text{reg},2} = -1800 \text{ mV}$) $1 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Parametry kalibračních přímků a dosažené meze stanovitelnosti jsou uvedeny v tab. 3.2.

Stanovení 2-NBP v modelových vzorcích říční vody

Na obr. 3.6 jsou zaznamenány voltamogramy 2-NBP v říční vodě naměřené metodou DCV (A) s regenerací ($E_{\text{reg},1} = -500$ mV, $E_{\text{reg},2} = -1700$ mV) a DPV (B) s regenerací ($E_{\text{reg},1} = -0$ mV, $E_{\text{reg},2} = -1800$ mV).



Obr. 3.6 Voltamogramy 2-NBP naměřené metodou DCV (A) s regenerací ($E_{\text{reg},1} = -500$ mV, $E_{\text{reg},2} = -1700$ mV) a DPV (B) s regenerací ($E_{\text{reg},1} = -0$ mV, $E_{\text{reg},2} = -1800$ mV) na m-AgSAE v modelových v prostředí $0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ LiOH-říční voda (1:9). c (2-NBP): 0 (1); $2 \cdot 10^{-7}$ (2); $4 \cdot 10^{-7}$ (3); $6 \cdot 10^{-7}$ (4); $8 \cdot 10^{-7}$ (5) a $10 (6) \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Vloženy závislosti proudu píků I_p 2-NBP na koncentraci v rozmezí $(2-10) \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$; - - - konfidenční pás; predikční pás.

Na m-AgSAE bylo v modelových vzorcích říční vody metodou DCV s regenerací ($E_{\text{reg},1} = -500$ mV, $E_{\text{reg},2} = -1700$ mV) dosaženo meze stanovitelnosti 2-NBP $2 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a metodou DPV $1 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Parametry kalibračních přímek a dosažené meze stanovitelnosti jsou uvedeny v tab. 3.2.

3.2.4 Adsorpční rozpouštěcí diferenční pulzní voltametrie 2-NBP

Ke snížení limitu detekce 2-NBP metodou DPV na m-AgSAE byla ověřena možnost využití AdSDPV.

Na základě výsledků optimalizace měření byla použita při každém měření regenerace (pro prostředí LiOH o pH 12,0 $E_{\text{reg},1} = 0$ mV, $E_{\text{reg},2} = -1800$ mV, v ostatních prostředích dle krajů potenciálového okna). Měření byla provedena ve vodném prostředí.

Roztok byl připraven z příslušného množství zásobního roztoku 2-NBP ($c = 1 \cdot 10^{-4}$ mol·l⁻¹) a doplněn vybraným pufrům do 10 ml.

Vliv pH na voltametrické chování 2-NBP ($c = 4 \cdot 10^{-7}$ mol·l⁻¹) byl studován v prostředí BR pufru o pH 2,1, 0,25 mol·l⁻¹ acetátového pufru o pH 4,8, 0,025 mol·l⁻¹ fosfátového pufru o pH 7,0 a 0,01 mol·l⁻¹ LiOH o pH 12,0. Hodnota potenciálu akumulace (E_{acc}) byla volena jako potenciál píku (E_p) a dále jako $E_p + (100-400)$ mV, doba akumulace (t_{acc}) byla 60 s.

Za výše uvedených podmínek nebyla míra akumulace dostatečná, pro stanovení 2-NBP metodou AdSDPV na m-AgSAE nebyly nalezeny vhodné podmínky.

Tab. 3.2 Parametry kalibračních přímek stanovení 2-NBP na m-AgSAE a příslušné meze stanovitelnosti (*LOD*).

metoda	prostředí	koncentrace [mol·l ⁻¹]	směrnice [mA·mol ⁻¹ ·l]	úsek [nA]	R^2	LOD [mol·l ⁻¹]
DCV	MeOH – 0,01 mol·l ⁻¹ LiOH (1:9)	$(2-10) \cdot 10^{-5}$	-1,2	-16,45	0,9937	-
	MeOH – 0,01 mol·l ⁻¹ LiOH(1:9)	$(2-10) \cdot 10^{-6}$	-1,2	-0,95	0,9969	-
	MeOH – 0,01 mol·l ⁻¹ LiOH (1:9)	$(2-10) \cdot 10^{-7}$	-1,8	-0,66	0,9369	$2 \cdot 10^{-7}$
DPV	MeOH – 0,01 mol·l ⁻¹ LiOH (1:9)	$(2-10) \cdot 10^{-5}$	-1,5	-2,85	0,9995	-
	MeOH – 0,01 mol·l ⁻¹ LiOH (1:9)	$(2-10) \cdot 10^{-6}$	-1,5	-0,23	0,9998	-
	MeOH – 0,01 mol·l ⁻¹ LiOH (1:9)	$(2-10) \cdot 10^{-7}$	-1,7	-0,07	0,9994	$1 \cdot 10^{-7}$
DCV	pitná voda – 0,01 mol·l ⁻¹ LiOH (9:1)	$(2-10) \cdot 10^{-7}$	-1,7	-0,50	0,9916	$2 \cdot 10^{-7}$
DPV	pitná voda – 0,01 mol·l ⁻¹ LiOH (9:1)	$(2-10) \cdot 10^{-7}$	-4,7	-0,25	0,9915	$1 \cdot 10^{-7}$
DCV	říční voda – 0,01 mol·l ⁻¹ LiOH(9:1)	$(2-10) \cdot 10^{-7}$	-2,2	-0,39	0,9970	$2 \cdot 10^{-7}$
DPV	říční voda – 0,01 mol·l ⁻¹ LiOH(9:1)	$(2-10) \cdot 10^{-7}$	-2,4	-0,06	0,9977	$1 \cdot 10^{-7}$

3.3 Stanovení směsi 4-NBP a 2-NBP metodou DPV na m-AgSAE

3.3.1 Optimalizace prostředí

Obsah methanolu

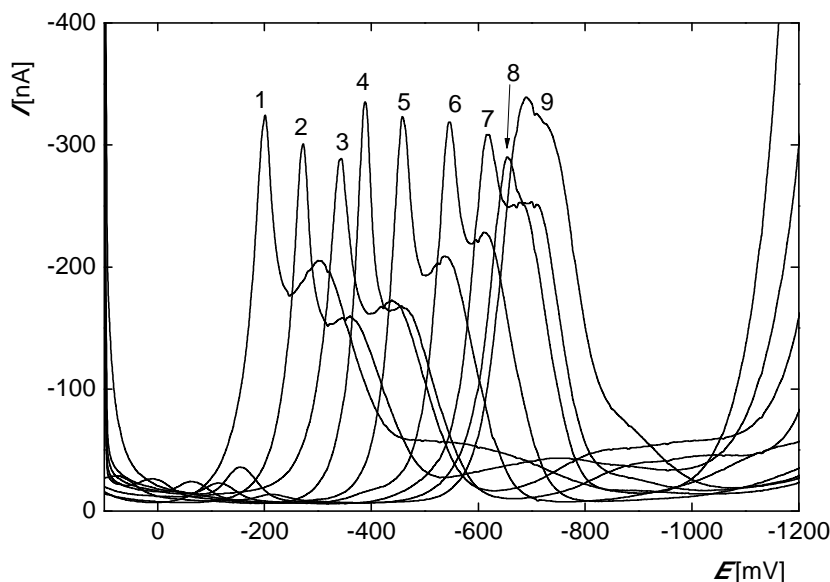
S ohledem na výsledky optimalizací obsahu methanolu a vodné fáze obou látek (rozpuštnost 4-NBP byla horší) byl pro měření směsi 2-NBP a 4-NBP vybrán jako optimální poměr methanol-vodná složka 3:7.

Optimalizace pH

Závislosti výšky píku 4-NBP a 2-NBP ve směsi na pH a rozdílu potenciálů píků na pH byly sledovány v prostředí MeOH-BR pufr o pH 2,1-10,0 (3:7).

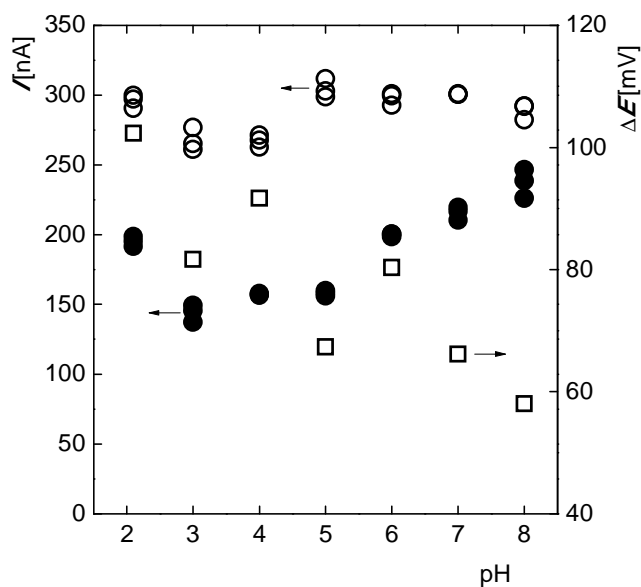
Voltamogramy směsi 4-NBP a 2-NBP (oba $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) naměřené metodou DPV na m-AgSAE při různém výsledném pH* (pH roztoku vzniklého smísením methanolu a BR pufru o daném pH) jsou na obr. 3.7.

Na obr.3.8 je v grafu vynesena závislost výšky píků 4-NBP a 2-NBP na pH a závislost rozdílu potenciálu píků 2-NBP a 4-NBP na pH.



Obr. 3.7 Voltamogramy směsi 4-NBP a 2-NBP naměřené metodou DPV s regenerací na m-AgSAE v prostředí MeOH-BR pufr (3:7) o pH*: 2,1 (1); 3,4 (2); 4,4 (3); 5,4 (4); 6,4 (5); 7,5 (6); 8,4 (7); 9,0 (10,1); 10,1 (9). $E_{\text{reg},1}$, $E_{\text{reg},1}$ dle krajů potenciálového okna.

Pro hodnoty pH BR pufru vyšší než 8,0 nebyl rozdíl potenciálů píků 4-NBP a 2-NBP dostačující, proto nebylo možné pro pH* 9,0 a 10,1 píky samostatně vyhodnotit.



Obr. 3.8 Závislost výšky píků (I_p) 4-NBP (○) a 2-NBP (●) ve směsi (oba $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) a rozdílu potenciálů píků ΔE (□) na pH. Hodnoty byly získány metodou DPV s regenerací na m-AgSAE v prostředí MeOH-BR pufr o pH 2,1-10,0 (3:7). $E_{\text{reg},1}$, $E_{\text{reg},1}$ dle krajů potenciálového okna. Potenciál píků byl měřen vůči používané referentní argentschloridové elektrodě.

Optimalizace složení základního elektrolytu

Vliv složení základního elektrolytu byl sledován metodou DPV na m-AgSAE v prostředí MeOH-příslušný pufr o pH 6,0 v poměru 3:7 a koncentraci 4-NBP a 2-NBP v roztoku $c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

Byl otestován BR pufr, $0,25 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ fosfátový pufr a $0,10 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ acetátový pufr (všechny o pH 6,0). Byla provedena série měření, při kterých byla pro jednotlivé pufrы sledována opakovatelnost měření s regenerací a bez regenerace. Jako optimální byl vybrán acetátový pufr.

Pro testování nutnosti regenerace byla použita směs 4-NBP a 2-NBP (oba $c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) v prostředí MeOH-AB pH 6,0 v poměru 3:7. Pro měření bez regenerace byly RSD výšky píků 20 měření 4-NBP 1,86% a 2-NBP 0,82%, pro měření

s regenerací dle krajů potenciálového okna $E_{\text{reg},1} = 0 \text{ mV}$ a $E_{\text{reg},2} = -1400 \text{ mV}$ byly *RSD* výšky píku 20 měření 4-NBP 3,52% a 2-NBP 2,30 %. Protože při některých měřeních bez regenerace byl přítomen pík, který se s píkem 4-NBP překrýval a který by v dalších měřeních mohl komplikovat vyhodnocení voltamogramů, bylo zvoleno měření s regenerací, ačkoliv *RSD* měření bez regenerace byla oproti měření s regenerací nižší.

Na základě získaných výsledků byly pro další měření směsi 4-NBP a 2-NBP technikou DPV na m-AgSAE zvoleny tyto podmínky: prostředí MeOH-0,10 mol·l⁻¹ acetátový pufr pH 6,0 (3:7), aplikace regeneračních potenciálů $E_{\text{reg},1} = 0 \text{ mV}$ a $E_{\text{reg},2} = -1400 \text{ mV}$.

3.3.2 DPV 4-NBP a 2-NBP ve směsi

Voltamogramy směsi obou látek byly proměřeny metodou DPV s regenerací $E_{\text{reg},1} = 0 \text{ mV}$; $E_{\text{reg},2} = -1400 \text{ mV}$ na m-AgSAE v prostředí MeOH-0,10 mol·l⁻¹ AB pH 6,0 (3:7).

Byla proměřena sada roztoků o koncentracích:

$c(2\text{-NBP}) = 0 \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $c(4\text{-NBP}) = 0$ resp. 2; 4; 6; 8 a $10\cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$

$c(2\text{-NBP}) = 2\cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $c(4\text{-NBP}) = 0$ resp. 2; 4; 6; 8 a $10\cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$

$c(2\text{-NBP}) = 4\cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $c(4\text{-NBP}) = 0$ resp. 2; 4; 6; 8 a $10\cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$

$c(2\text{-NBP}) = 6\cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $c(4\text{-NBP}) = 0$ resp. 2; 4; 6; 8 a $10\cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$

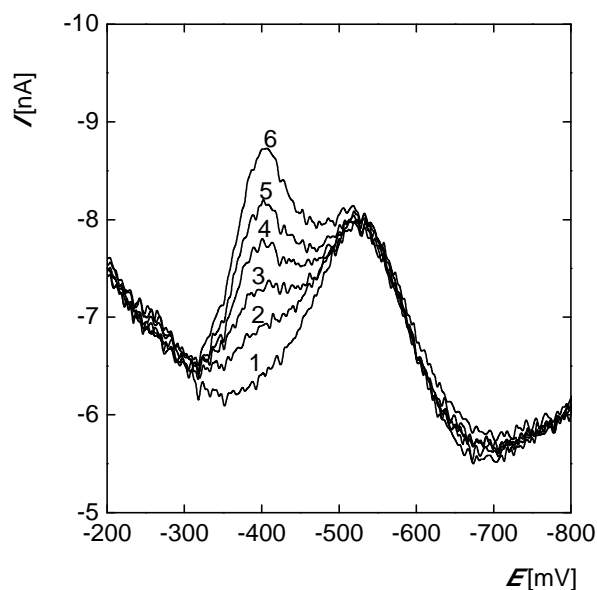
$c(2\text{-NBP}) = 8\cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $c(4\text{-NBP}) = 0$ resp. 2; 4; 6; 8 a $10\cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$

$c(2\text{-NBP}) = 10\cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$ a $c(4\text{-NBP}) = 0$ resp. 2; 4; 6; 8 a $10\cdot 10^{-6} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$

Analogicky pro koncentrační řád $10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

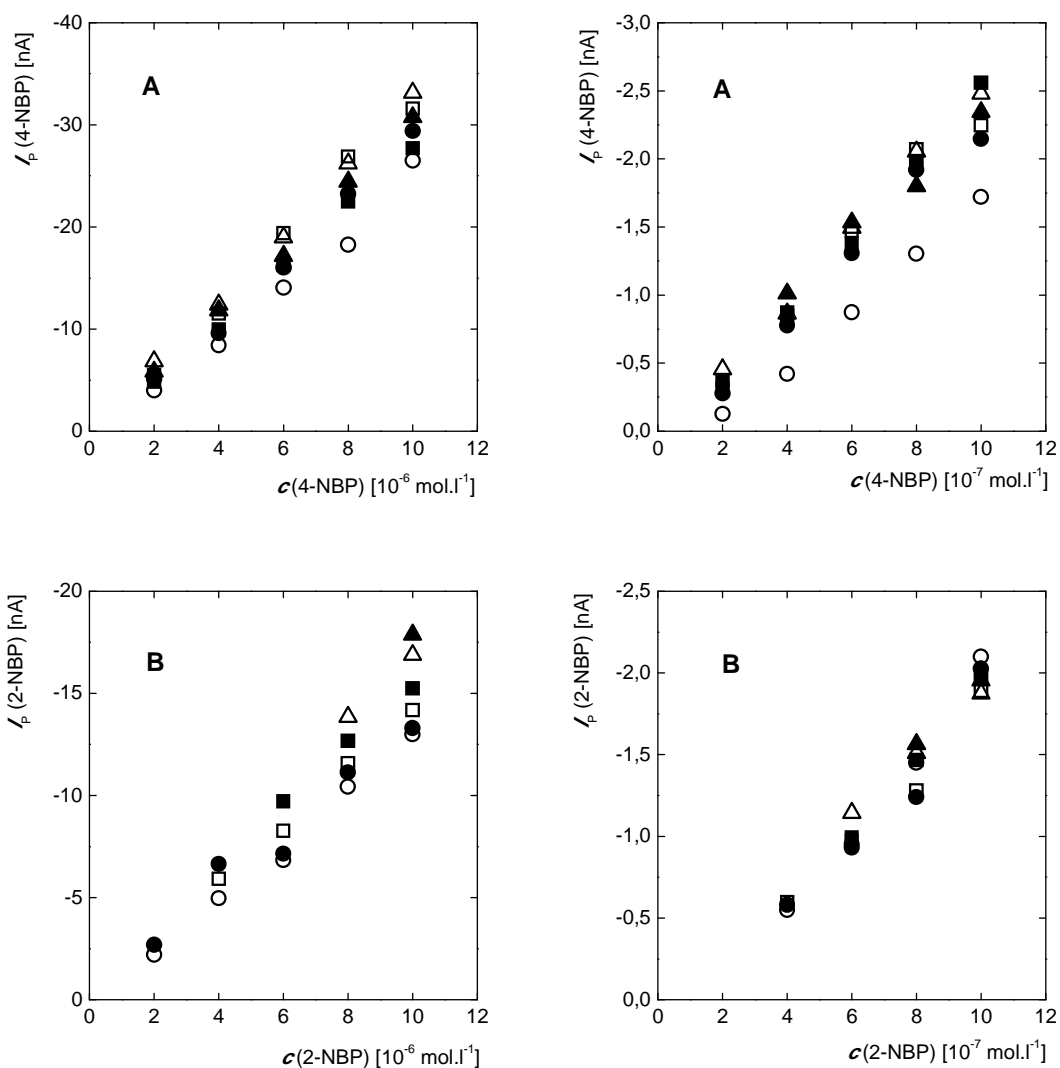
Na obr. 3.9 jsou voltamogramy směsi 4-NBP a 2-NBP pro konstantní koncentraci 4-NBP a proměnnou koncentraci 2-NBP a opačně, měřené za výše uvedených podmínek pro koncentrační řád $10^{-7} \text{ mol}\cdot\text{l}^{-1}$.

Na obr. 3.10 jsou vyneseny závislosti proudů píku 4-NBP (resp. 2-NBP) na koncentraci pro proměnné koncentrace 2-NBP (resp. 4-NBP) naměřené metodou DPV za výše uvedených podmínek.



Obr. 3.9 Voltamogramy směsi 2-NBP ($c = 10 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) a 4-NBP. c (4-NBP): 0 (1); 2 (2); 4 (3); 6 (4); 8 (5); 10 (6) $\cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Naměřené metodou DPV s regenerací $E_{\text{reg},1} = 0 \text{ mV}$; $E_{\text{reg},2} = -1400 \text{ mV}$ v prostředí MeOH-0,10 $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ AB pH 6,0 (3:7).

Závislost výšky píku 4-NBP za konstantní koncentrace 2-NBP a závislost výšky píku 2-NBP při konstantní koncentraci 4-NBP je lineární. Toho lze využít k analýze směsi obou látek metodou standardního přídatku.



Obr. 3.10 Závislost proudu píku 4-NBP (A) resp. 2-NBP (B) měřeného metodou DPV na m-AgSAE s regenerací $E_{\text{reg},1} = 0 \text{ mV}$; $E_{\text{reg},2} = -1400 \text{ mV}$ v prostředí MeOH- $0,10 \text{ mol.l}^{-1}$ AB pH 6,0 (3:7). Koncentrační rozmezí 4-NBP (2-NBP) ve směsi $(2-10) \cdot 10^{-6}$ a $(2-10) \cdot 10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$. $c(2\text{-NBP})$ resp. $c(4\text{-NBP})$: 0 (\circ); 2 (\bullet); 4 (\square); 6 (\blacksquare); 8 (\triangle); 10 (\blacktriangle) $\cdot 10^{-6}$ resp. $10^{-7} \text{ mol.l}^{-1}$.

3.4 Cyklická voltametrie

Voltamogramy 4-NBP a 2-NBP ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) byly proměřeny v prostředí MeOH–BR pufr o pH 2,1; 7,0 a 13,1 (3:7).

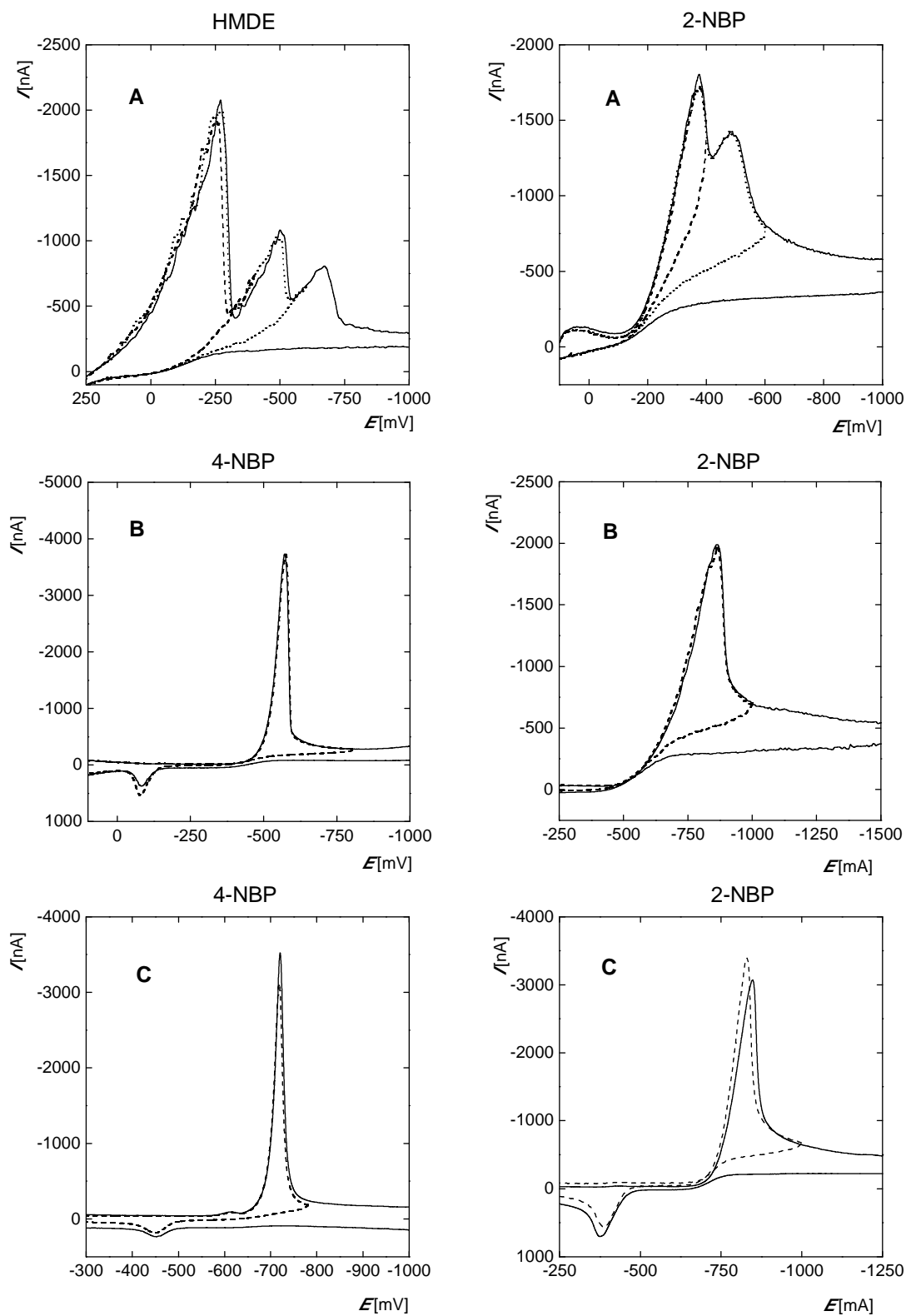
Na obr. 3.11 jsou voltamogramy 4-NBP a 2-NBP ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) v prostředí MeOH–BR pufr (pH 2,1; 7,0; 13,1) v poměru 3:7 získané technikou CV na HMDE s rychlostí polarizace $v_{sc} = 100 \text{ mV} \cdot \text{s}^{-1}$.

Na obr. 3.12 jsou voltamogramy 4-NBP a 2-NBP ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) v prostředí MeOH–BR pufr (pH 2,1; 7,0; 13,1) v poměru 3:7 získané technikou CV na m-AgSAE.

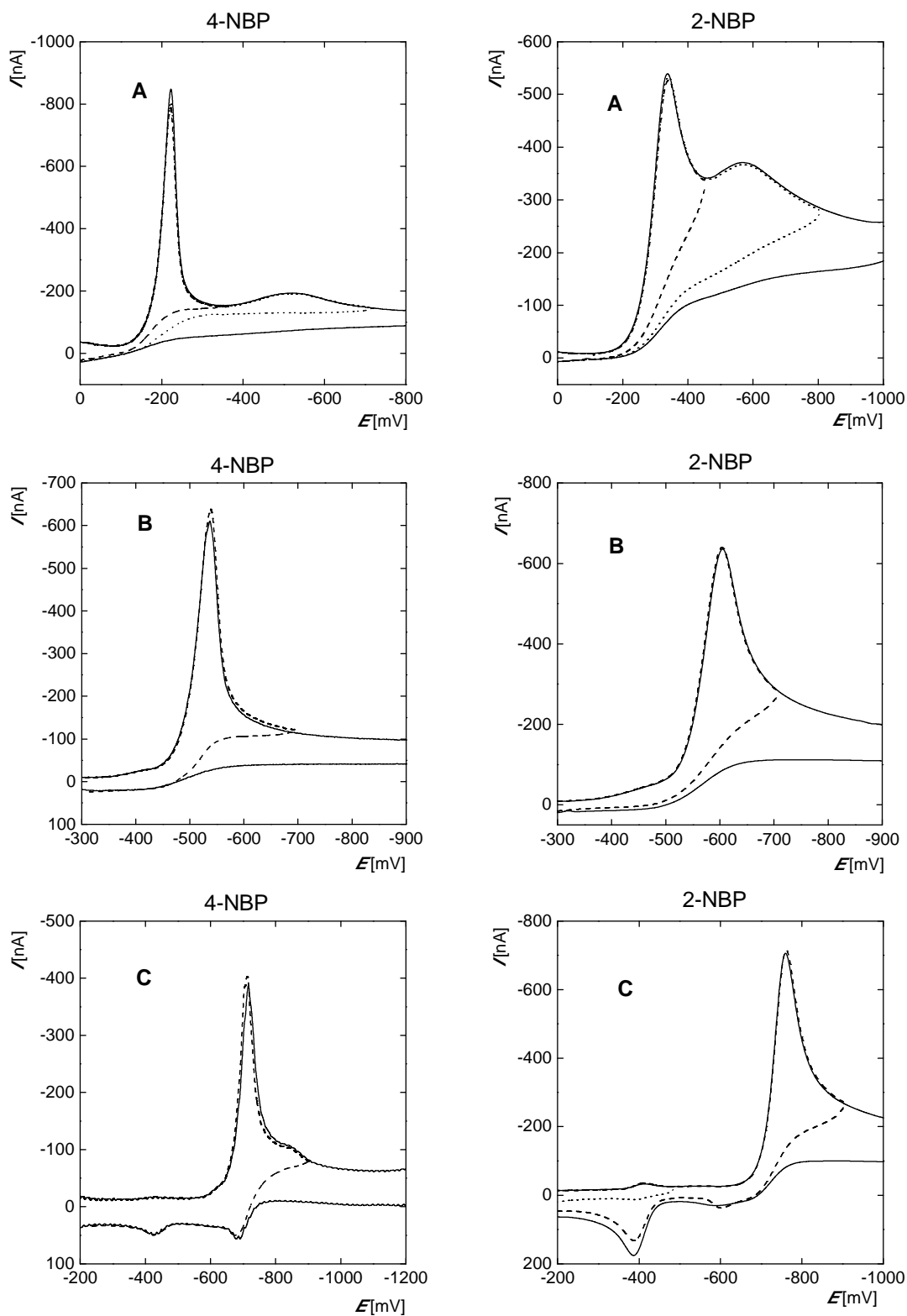
Pro obě látky byla proměřena závislost výšky katodického píku na druhé odmocnině z rychlosti polarizace v_{sc} (viz obr.3.13). Parametry lineárních závislostí jsou uvedeny v tab. 3.3.

Tab. 3.3 Parametry lineární závislosti výšky katodického píku 4-NBP a 2-NBP na druhé odmocnině z rychlosti polarizace. Naměřeno technikou CV na HMDE a m-AgSAE v prostředí MeOH-BR pufr (3:7).

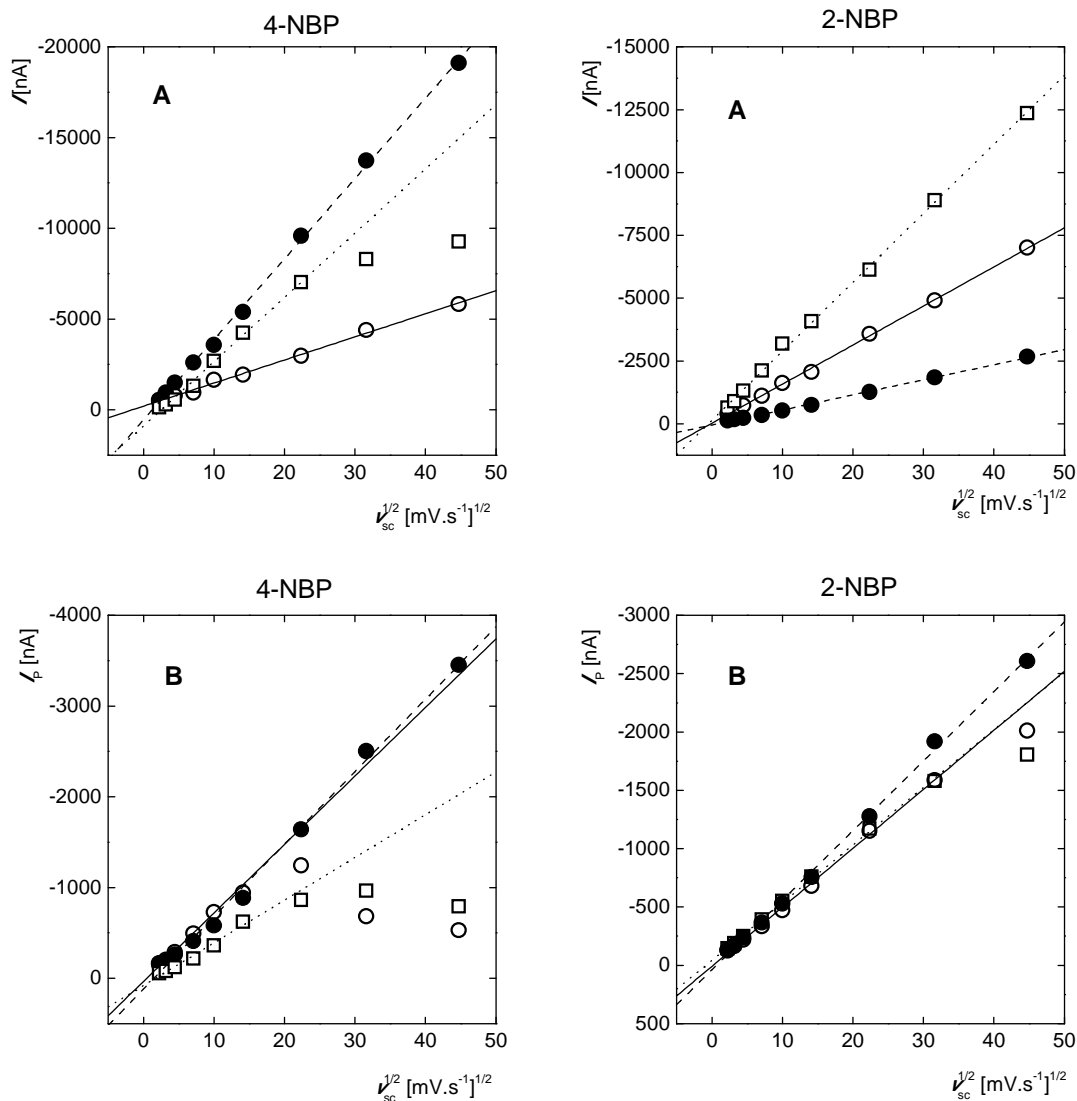
analyt	pracovní elektroda	pH BR pufru	v_{sc} [mV·s ⁻¹]	směrnice [nA·mV ^{-1/2} ·s ^{1/2}]	úsek [nA]	R ²
4-NBP	HMDE	2,1	5–2000	–202,31	–127,19	0,9959
		7,0	5–500	–443,16	552,68	0,9987
		13,1	5–2000	–354,10	888,00	0,9943
	m-AgSAE	2,1	5–200	–75,47	34,08	0,9969
		7,0	5–2000	–79,83	118,13	0,9945
		13,1	5–200	–47,03	79,61	0,9754
2-NBP	HMDE	2,1	5–2000	–155,45	–23,31	0,9990
		7,0	5–2000	–59,97	50,29	0,9986
		13,1	5–2000	–274,52	–138,5	0,9981
	m-AgSAE	2,1	5–1000	–50,55	8,39	0,9981
		7,0	5–2000	–59,61	37,89	0,9979
		13,1	5–1000	–49,43	–42,58	0,9987



Obr. 3.11 Cyklické voltamogramy 4-NBP a 2-NBP ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) naměřené na HMDE v prostředí MeOH–BR pufr o pH 2,1 (A), 7,0 (B); 13,1 (C) (3:7). — sken v celém potenciálovém rozsahu, --- sken přepnutý po prvním katodickém píku; sken přepnutý po druhém katodickém píku.



Obr. 3.12 Cyklické voltamogramy 4-NBP a 2-NBP ($c = 1 \cdot 10^{-4} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) naměřené na m-AgSAE v prostředí MeOH–BR pufr o pH 2,1 (A), 7,0 (B); 13,1 (C) (3:7). — sken v celém potenciálovém rozsahu, --- sken přepnutý po prvním katodickém píku; sken přepnutý po druhém katodickém píku.



Obr. 3.13 Závislost výšky katodického píku 4-NBP a 2-NBP na druhé odmocnině z rychlosti polarizace. Hodnoty naměřené metodou CV v prostředí MeOH–BR pufr (3:7) o pH 2,1 (○, —), 7,0 (●, - - -) a 13,1 (□,) na HMDE (A) a na m-AgSAE (B).

Pro vybrané rozsahy polarizačních rychlostí a obě použité pracovní elektrody lze za daných podmínek měření závislosti výšky píků 4-NBP a 2-NBP na odmocnině z polarizační rychlosti popsat lineární závislostí. Úseky proložených přímek nejsou statisticky významně odlehle, lze tedy předpokládat, že redukční děje probíhající na povrchu elektrody jsou řízeny difúzí.

3.5 Interakce studovaných látek s DNA

Interakce 4-NBP, 2-NBP, 3-NBP, NB a PNP s DNA byly zkoumány ve směsném prostředí organická složka-pufr v poměru 1:1 a 1:9. Jako organická složka byl testován methanol a ethanol.

Byl studován vliv matrice roztoku, v němž je doporučeno rozpouštět a uchovávat DNA, a vliv obsahu organické složky na interakci studovaných látek s DNA v měřeném roztoku. Dále byla uvažována možnost využití rozdílné interakce látek s DNA k lepšímu oddělení jejich signálů při voltametrickém stanovení směsi na HMDE.

Ke zjednodušení přehledu o výsledné koncentraci DNA v roztoku v závislosti na přídatku roztoku DNA v deionizované vodě slouží tab. 2.2 (viz str. 24).

3.5.1 Optimalizace složení základního elektrolytu

Vliv obsahu použitého pufru byl sledován v prostředí MeOH-pufr (1:9). Byl otestován $0,25 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ fosfátový pufr o pH 7,0 a $0,10 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ acetátový pufr o pH 6,0. Technikou DPV na HMDE byly změřeny pro každý roztok tři křivky základního elektrolytu v širší potenciálového okna. Na základě výsledků byl jako vhodnější (zejména s ohledem na nižší obsah nečistot) vybrán fosfátový pufr.

Dále byl zkoumán vliv použité organické složky, byl testován methanol a ethanol. Roztoky byly připraveny a proměřeny stejným způsobem jako při sledování vlivu použitého pufru. Na základě výsledků byl jako vhodnější (opět s ohledem na nižší obsah nečistot) vybrán ethanol.

Další měření byla prováděna v prostředí EtOH- $0,25 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ fosfátový pufr o pH 7,0.

3.5.2 Vliv matrice roztoku DNA

Vliv matrice roztoku, ve kterém byla rozpuštěna DNA, byl sledován metodou DPV na HMDE na roztoku 4-NBP ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) v prostředí ethanol-0,25 $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ fosfátový pufr pH 7,0 (1:1). Nejprve byl k roztoku 4-NBP přidáván roztok DNA v EDTA/Tris-HCl ($c_{\text{DNA}} = 10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$). K dalšímu měřenému roztoku byl přidáván roztok EDTA/Tris-HCl. Stejným způsobem byl sledován vliv jednotlivých složek roztoku EDTA/Tris-HCl: roztoku EDTA ($c = 1 \text{ mmol} \cdot \text{l}^{-1}$) a roztoku Tris-HCl ($c = 0,01 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$), a roztok, k němuž byl přidáván roztok DNA v deionizované vodě ($c_{\text{DNA}} = 10 \text{ mg} \cdot \text{ml}^{-1}$).

Byl sledován posun potenciálu píku, jehož hodnota byla měřena vůči používané referentní argentchloridové elektrodě, a změna výšky píku 4-NBP.

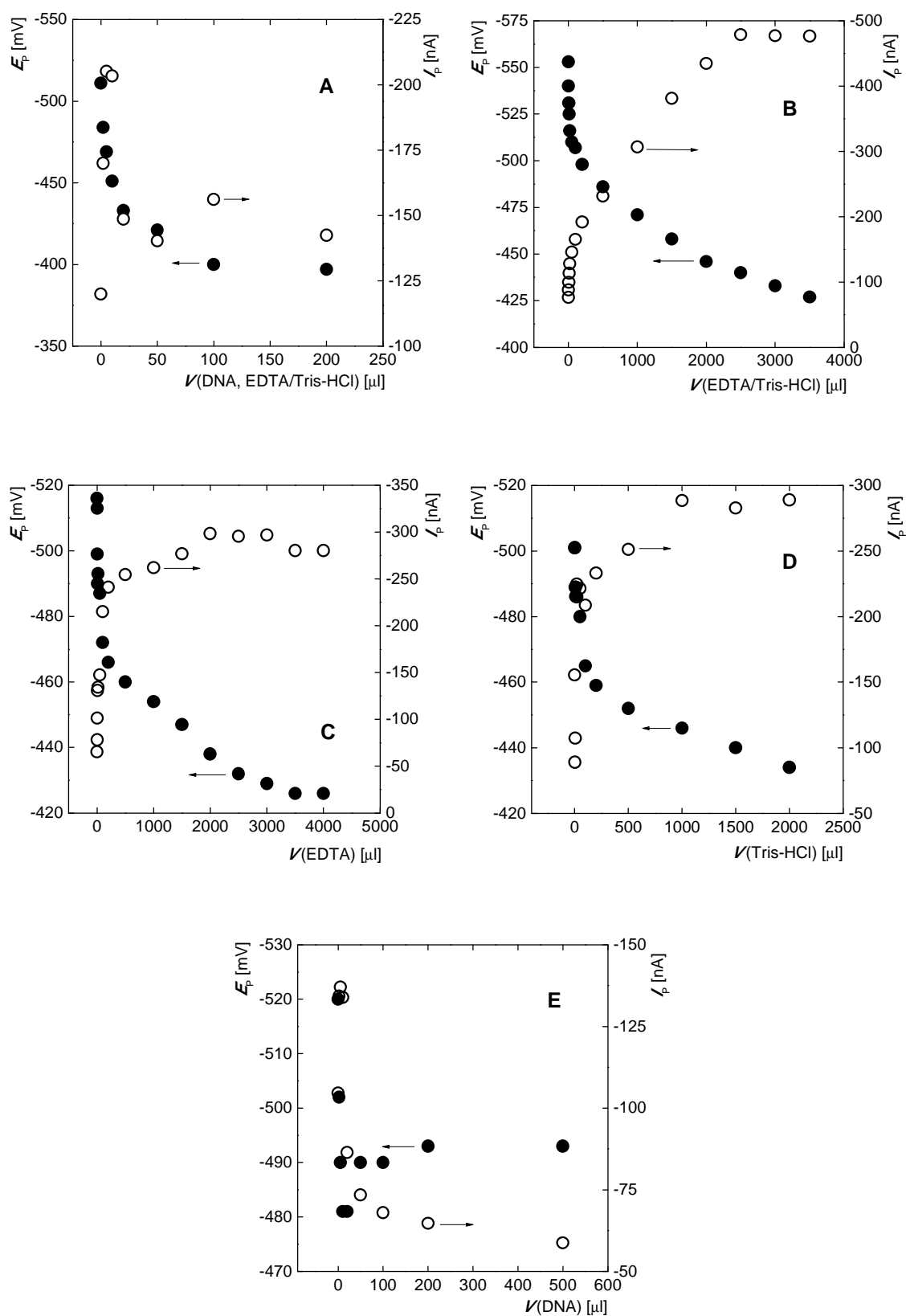
Na obr. 3.14 jsou závislosti výšky píku a půlvolného potenciálu na objemu přídatku roztoku DNA v EDTA/Tris-HCl, roztoku EDTA/Tris-HCl, roztoku EDTA, roztoku Tris-HCl a roztoku DNA ve vodě.

Při měření za výše uvedených podmínek došlo vlivem přídatku EDTA/Tris-HCl a jejích jednotlivých složek ke zvýšení píku 4-NBP a posunu potenciálu píku ke kladnějším hodnotám. Součet absolutního zvýšení píku vlivem Tris-HCl a EDTA odpovídá přibližně hodnotě absolutního zvýšení píku při přídatku EDTA/Tris-HCl.

Srovnáním měření s přídatkem DNA v EDTA/Tris-HCl a DNA v H₂O je zřejmý vliv EDTA/Tris-HCl na celkové elektrochemické chování studované látky. Posun potenciálu píku a změna výšky píku 4-NBP jsou různé.

Stejný postup a srovnání byly zopakovány pro poměr EtOH-0,25 $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ fosfátový pufr pH 7,0 (1:9) a i zde byl zaznamenán vliv EDTA/Tris-HCl na celkové elektrochemické chování 4-NBP.

Proto bylo dále pracováno s roztokem DNA připraveným v deionizované vodě, aby byl vliv EDTA/Tris-HCl vyloučen.



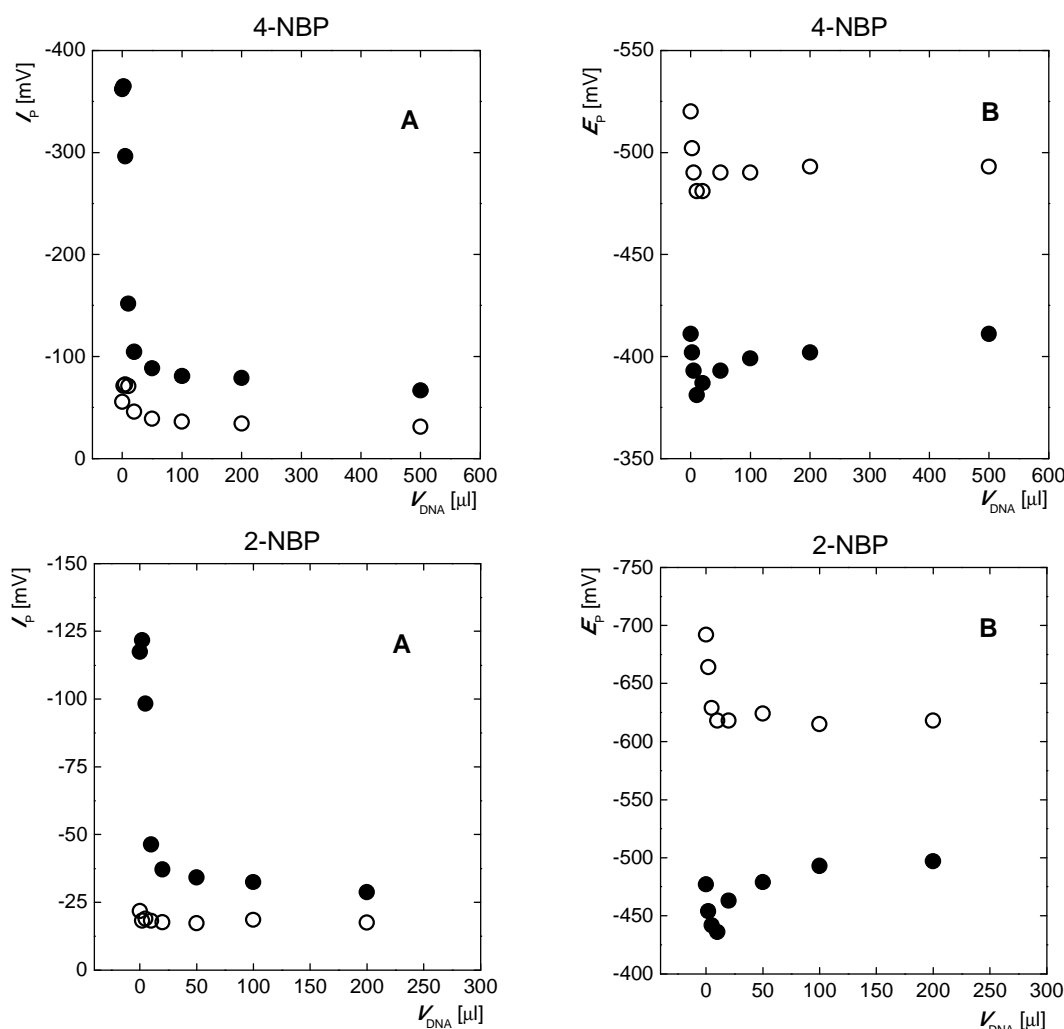
Obr. 14 Závislost výšky píku (\circ) a pólvinového potenciálu (\bullet) 4-NBP na přidavku DNA v EDTA/Tris-HCl (A), EDTA/Tris-HCl (B), EDTA (C), Tris-HCl (D) a DNA ve vodě. Měřeno technikou DPV na HMDE. Potenciál píku byl měřen vůči používané referentní argenchloridové elektrodě.

3.5.3 Interakce studovaných látek s DNA

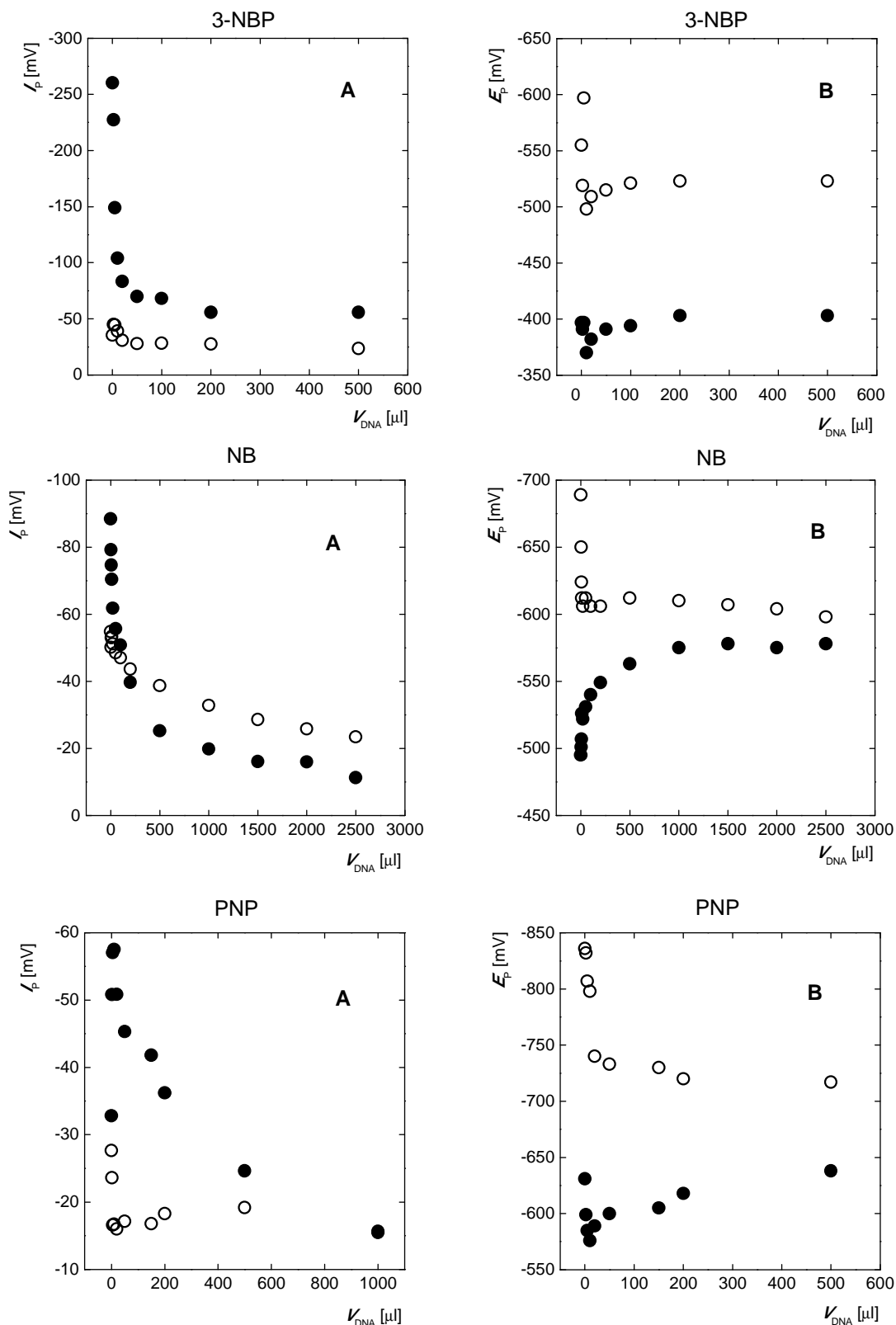
Vliv přidavku DNA v měřeném roztoku byl sledován v roztocích 4-NBP, 2-NBP, 3-NBP, NB a PNP ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) v prostředí EtOH-0,25 $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ fosfátový pufr pH 7,0 pro poměry 1:1 a 1:9.

Zároveň na základě výsledků těchto měření bylo možné zobecnit vliv obsahu ethanolu na interakci DNA se studovanými látkami.

Na obr. 3.15 jsou závislosti výšky píků a potenciálů píků všech studovaných látek, získaných metodou DPV na HMDE v prostředí EtOH-fosfátový pufr pH 7,0 ($c = 0,025 \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) v poměru 1:1 a 1:9. Potenciál píku byl měřen vůči používané referentní argentchloridové elektrodě.



Obr. 3.15 Závislost výšky píku (A) a potenciálu píku (B) studovaných látek ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) na objemu přidavku DNA v deionizované vodě. Měřenou technikou DPV na HMDE v prostředí EtOH-fosfátový pufr pH 7,0 v poměru 1:1 (○) a 1:9 (●).



Obr. 3.15 Závislost výšky píku (A) a potenciálu píku (B) studovaných látek ($c = 1 \cdot 10^{-5} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$) na objemu přidavku DNA v deionizované vodě. Měřenou technikou DPV na HMDE v prostředí EtOH-fosfátový pufr pH 7,0 v poměru 1:1 (○) a 1:9 (●).

Z posunů potenciálu píku lze vyvodit, k jakému typu interakce studované látky s DNA dochází.

4-NBP

Při malých přídavicích DNA (do 10 μl) dochází pravděpodobně k interkalaci 4-NBP mi páry bazí DNA. Při vyšším přídávku DNA se potenciál píku posouvá k zápornějším hodnotám. V prostředí EtOH-0,25 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ PB pH 7,0 (1:9) je posun potenciálu vyšší a je konečný potenciál je zápornější než původní, u poměru 1:1 nedojde k návratu potenciálu píku na výchozí hodnotu.

V prostředí EtOH-0,25 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ PB pH 7,0 (1:1) dochází při přídávku DNA 2 μl k nárůstu proudu z původních -55 nA na -77 nA , při dalších přídavicích proud píku strmě klesá a od přídávku 100 μl klesá proud 4-NBP na limitní hodnotu přibližně -36 nA , což je 44% z původní hodnoty proudu. Pro poměr EtOH-PB 1:9 dochází ke zmenšení proudu píku od prvního přídávku, až k poklesu proudu z -360 nA na limitní hodnotu přibližně -80 nA , tedy na 22% z původní hodnoty.

2-NBP

Pro poměr EtOH-0,25 $\text{mol}\cdot\text{l}^{-1}$ PB pH 7,0 1:1 se potenciál píku posouvá ke kladnějším hodnotám a od přídávku 100 μl DNA se ustaluje na limitní hodnotě přibližně -620 mV . Na základě toho lze říci, že za těchto podmínek dochází k elektrostatické interakci 2-NBP s fosfátovými skupinami DNA. Pro poměr EtOH-PB 1:9 dochází do celkového přídávku DNA 10 μl k posunu píku ke kladným hodnotám, což opět značí elektrostatickou interakci. Od vyšších přídavků DNA se potenciál píku posouvá k záporným hodnotám, které jsou vyšší, než původní potenciál píku 2-NBP bez přídávku DNA.

Při přídavicích DNA k roztoku o poměru EtOH-PB 1:1 dochází po prvním přídávku DNA k poklesu proudu na přibližně 80% původní hodnoty proudu píku 3-NBP, na této hodnotě se proud ustaluje. Při poměru EtOH-PB 1:9 dochází po prvním přídávku k mírnému zvýšení proudu píku (cca na 105%), při dalších přídavicích k jeho poklesu a od celkového přidaného objemu DNA 50 μl k jeho ustálení na hodnotě odpovídající přibližně 24% původní hodnoty.

3-NBP

V prostředí EtOH-0,25 mol·l⁻¹ PB pH 7,0 1:1 dochází při přidavku 5 µl DNA k nejvyššímu posunu píku k záporným hodnotám, od dalších přidavků se potenciál píku 3-NBP posouvá ke kladnějším hodnotám a od přidavku DNA 100 µl se jeho hodnota nemění a zůstává kladnější, než byl potenciál původní. Lze říci, že při malém přidavku DNA dochází k interkalaci 3-NBP. Pro poměr EtOH-PB 1:9 při přidavcích DNA o celkovém objemu 5 µl se potenciál píku posouvá k záporným hodnotám. Od přidavku 10 µl DNA, kdy je potenciál píku kladnější, než původní, dochází k posunu píku zpět k záporným hodnotám, vyšším, než jaká byla původní. Při zvoleném poměru a malém přidavku DNA (do 5 µl) dochází k elektrostatické interakci.

Pro oba poměry EtOH-PB proud píku 3-NBP klesá k limitním hodnotám. Pro poměr 1:1 po prvním přidavku 2 µl DNA proud píku nejprve stoupá přibližně na 135% původní hodnoty, ale další průběh změny píku je stejný, jako pro poměr 1:9. Stejně jako u 4-NBP je pokles píku 3-NBP pro poměr 1:1 (přibližně na 57% původní výšky píku) méně rapidní než pro poměr 1:9 (přibližně na 19% původní výšky píku).

NB

Nitrobenzen byl testován jako látka, u které se nepředpokládala interakce s DNA. Pro poměr EtOH-0,25 mol·l⁻¹ PB pH 7,0 1:1 došlo během prvních přidavků do objemu 10 µl k posunu potenciálu píku ke kladnějším hodnotám a ustálení na hodnotě kladnější oproti původnímu potenciálu píku NB. Tímto posunem se vyznačuje elektrostatická interakce NB s DNA. U poměru EtOH-PB 1:9 došlo naopak k posunu píku k záporným potenciálům a k ustálení na konstantní hodnotě, tudíž k interkalaci NB do struktury DNA.

Výchozí předpoklad, že NB nebude s DNA interagovat, se tedy nepotvrdil.

Proud píku NB se při měření v prostředí EtOH-PB v poměru 1:1 zmenšuje. Při přidavcích do 5 µl DNA proud klesá strmě přibližně na 70% původní hodnoty. Při dalších přidavcích dále zvolna klesá. V prostředí EtOH-PB 1:9 je opět zaznamenán strmý pokles proudu, přibližně na 30% z původní hodnoty, a poté pozvolný pokles. Pro oba poměry výška píku NB od přidavku 500 µl DNA lineárně klesá se stejnou směrnici, což lze vysvětlit zředováním roztoku.

U této látky je ze sledování závislosti výšky píku na přidavku DNA dobře patrný vliv obsahu ethanolu na elektrochemické chování látek v přítomnosti DNA v měřeném roztoku. Této problematice bude věnována další diskuze.

PNP

V prostředí EtOH-0,25 mol·l⁻¹ PB pH 7,0 1:1 při přidavcích DNA do objemu 10 µl lze z posunu potenciálu píku PNP ke kladným hodnotám usuzovat, že dochází k elektrostatické interakci PNP. Od přidavku 10 µl se potenciál píku ustaluje na konstantní hodnotě, která je kladnější, než potenciál píku před přidavkem DNA. V prostředí EtOH-PB 1:9 dochází ke změnám hodnoty potenciálu píku také do objemu přidavku DNA 10 µl – potenciál se posouvá ke kladným hodnotám a poté zpět k záporným a při přidavku 500 µl je již více záporný než původní potenciál píku PNP. Lze tedy vyvodit, že při přidavku do 10 µl dochází stejně jako v prostředí EtOH-PB 1:1 k elektrostatické interakci.

Pro poměr EtOH-PB 1:1 došlo k poklesu výšky píku PNP od prvního přidavku roztoku DNA. V prostředí EtOH-PB 1:9 proud PNP do přidavku DNA 10 µl roste, ale následně klesá. Sejně jako u předchozích studovaných látek, i u PNP v prostředí EtOH-PB 1:9 je pokles proudu píku strmějším než pro poměr 1:1.

3.5.4 Vliv obsahu ethanolu

Z provedených měření je patrné, že na interakci studovaných látek s DNA má vliv obsahu ethanolu. Obsah ethanolu v roztoku má vliv na rychlost redukce studovaných látek, tím lze vysvětlit rozdílnou počáteční výšku píků jednotlivých studovaných látek v prostředí EtOH-0,25 mol·l⁻¹ PB pH 7,0 1:1 a 1:9. Další vlastností, kterou obsah ethanolu ovlivňuje a která má dopad na elektrochemické chování, potažmo na interakci studovaných látek s DNA, je iontová síla roztoku.

V prostředí EtOH-PB 1:9 u NB došlo k posunu potenciálu k zápornějším hodnotám a pro ostatní látky od koncentrace DNA ve vzorku $c_{\text{DNA}} = 196 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ potenciál píku byl také zápornější, než původní hodnota.

Pro poměr EtOH-PB 1:1 došlo u NB a 2-NBP k posunu píku ke kladnějším hodnotám a u ostatních látek k posunu ke kladnějším hodnotám, a poté k mírnému posunu zpět k původní hodnotě. Pro všechny studované látky byl potenciál píku od koncentrace DNA $c_{\text{DNA}} = 99 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ v roztoku posunut ke kladnějším hodnotám.

Z provedených měření lze vyvodit, že pro sledování interakce těchto látek s DNA je vhodné pracovat v prostředí, v němž bude obsah ethanolu co nejnižší, aby byla interakce látky s DNA co nejméně ovlivněna.

3.5.5 Stanovení směsi studovaných látek s využitím rozdílné interakce s DNA

Po proměření všech studovaných látek byly porovnány posuny potenciálů píků v prostředí EtOH-0,25 mol·l⁻¹ PB pH 7,0 1:1 a 1:9 a uvažována možnost využití rozdílných interakcí k oddělení signálů ve směsi

Směs nitrobifenyly: jelikož je pro obě studovaná prostředí chování všech tří derivátů po přidavku DNA k měřenému roztoku DNA velmi podobné, není možné přidavek DNA využít k oddělení signálů těchto látek.

Nitrobifenyly a PNP: nejvyšší rozdíl potenciálů píků byl zaznamenán v prostředí ethanol-PB 1:1 při nulovém přidavku DNA. V prostředí EtOH-PB 1:9 sice při přidavku 1000 µl DNA ($c_{\text{DNA}} = 909 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$), dochází ke zvětšení rozdílu potenciálů, avšak rozdíl je přibližně o 90 mV menší než při poměru 1:1 bez přidavku DNA. Zároveň dochází k výraznému snížení výšky píku nitrobifenyly.

NB a ostatní studované látky: posun potenciálu píku NB byl pro obě prostředí při koncentraci DNA v roztoku $c_{\text{DNA}} = 909 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ nejvyšší (přibližně 100 mV), pro poměr EtOH-PB 1:1 ke kladnějším hodnotám a pro poměr EtOH-PB 1:9 k zápornějším hodnotám. V prostředí EtOH-PB 1:9 by bylo možné využít zvětšujícího se rozdílu potenciálu píku mezi nitrobifenyly a NB, nicméně při přidavku DNA, kdy je koncentrace $c_{\text{DNA}} = 909 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ je již proud nitrobifenyly snížen přibližně na 10% původní hodnoty, čímž by se snížila LOD. Pro tento případ bylo také zvažováno další přidávání roztoku DNA, aby byl proud jednoho z píků potlačen zcela, ale od koncentrace $c = 909 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ byly proudy velmi nízké a dalším přidavkem nedocházelo k výraznému zvětšení rozdílu mezi nimi. K oddělení signálů PNP a NB dochází v prostředí EtOH-PB 1:1 při koncentraci DNA v roztoku $c_{\text{DNA}} = 5 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Avšak zvětšení rozdílu potenciálů není dostatečné, aby bylo možno jej dále využít.

4 ZÁVĚR

1. Byly ověřeny metody stanovení 4-NBP technikami DCV a DPV na m-AgSAE v modelových vzorcích říční vody. Metodou DCV bez regenerace bylo dosaženo meze stanovitelnosti $c_{RV} = 2 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a metodou DPV s regenerací ($E_{\text{reg},1} = 0 \text{ mV}$, $E_{\text{reg},2} = -1300 \text{ mV}$) $c_{RV} = 2 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Byla zkoumána možnost využití AdSDPV ke stanovení 4-NBP na m-AgSAE v deionizované vodě pro prostředí o různém pH, ale nebyly nalezeny vhodné podmínky.

2. Při stanovení 2-NBP metodami DCV a DPV na m-AgSAE bylo zjištěno, že látka poskytuje v závislosti na pH jeden nebo dva píky. Optimálním prostředím pro stanovení 2-NBP oběma metodami je methanol-0,01 $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ LiOH 1:9. Měřením metodou DCV s regenerací ($E_{\text{reg},1} = -500 \text{ mV}$, $E_{\text{reg},2} = -1700 \text{ mV}$) bylo dosaženo meze stanovitelnosti $2 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a metodou DPV s regenerací ($E_{\text{reg},1} = 0 \text{ mV}$, $E_{\text{reg},2} = -1800 \text{ mV}$) meze stanovitelnosti $1 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Vyvinuté metody stanovení 2-NBP na m-AgSAE byly otestovány pro modelové vzorky pitné a říční vody. V pitné vodě i říční vodě bylo metodou DCV dosaženo meze stanovitelnosti $2 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ metodou DPV $1 \cdot 10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$. Pro stanovení 2-NBP technikou AdSDPV na m-AgSAE v deionizované vodě nebyly nalezeny vhodné podmínky.

Mez stanovitelnosti 2-NBP na HMDE [2] byla metodou DCV $2,9 \cdot 10^{-6} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ a metodou DPV $3,1 \cdot 10^{-8} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$.

3. Byly nalezeny optimální podmínky analýzy směsi 2-NBP a 4-NBP metodou DPV s regenerací ($E_{\text{reg},1} = 0 \text{ mV}$; $E_{\text{reg},2} = -1400 \text{ mV}$) na m-AgSAE. Optimálním prostředím je methanol-0,10 $\text{mol} \cdot \text{l}^{-1}$ AB pH 6,0 (3:7). Pro koncentrační řády 10^{-6} a $10^{-7} \text{ mol} \cdot \text{l}^{-1}$ byla proměřena závislost výšky píku 4-NBP a 2-NBP koncentraci za konstantní koncentrace 2-NBP resp. 4-NBP. Pro oba koncentrační řády je závislost výšky píku 4-NBP 2-NBP lineárně závislá na koncentraci látky v měřeném roztoku.

Použitá pracovní elektroda m-AgSAE se tedy nabízí k analýze směsi 4-NBP a 2-NBP jako vhodná alternativa k HMDE, která byla použita ke stejnému účelu Štěpánem [2].

4. Metodou cyklické voltametrie na HMDE a m-AgSAE v prostředí methanol-BR pufr (pH 2,1; 7,0 a 13,1) 3:7 bylo zjištěno, že ve vybraných rozsazích rychlosti polarizace jsou závislosti proudu píku 4-NBP a 2-NBP na odmocnině z rychlosti polarizace lineární. Z toho lze vyvodit, že v těchto rozmezích polarizačních rychlostí jsou redukční děje řízeny difúzí.

5. V prostředí ethanol-0,25 mol·l⁻¹ PB pH 7,0 1:1 a 1:9 byl technikou DPV na m-AgSAE studován vliv *ds*DNA na elektrochemické chování 4-NBP, 2-NBP, 3-NBP, NB a PNP. Koncentrace DNA ve studovaném roztoku byly $c_{\text{DNA}} = 2\text{--}2500 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$. Elektrochemické chování je ovlivněno interakcí studovaných látek se strukturou DNA. Typ těchto interakcí je možné odhadnout na základě posunu potenciálu píku. Bylo zjištěno, že na elektrochemické chování studovaných látek za přítomnosti DNA v měřeném roztoku má vliv obsah ethanolu. Při poměru EtOH-PB 1:1 došlo k posunu potenciálu píku ke kladnějším hodnotám, což by poukazovalo na elektrostatickou interakce studované látky s DNA. Zatímco při poměru EtOH-PB 1:9 byl potenciál píku při koncentracích DNA větší než $99 \mu\text{g}\cdot\text{ml}^{-1}$ větší, než původní potenciál, což je důsledkem interkalace planární části molekuly mezi baze DNA.

6. Jelikož posuny potenciálů píků všech studovaných látek pro oba studované poměry ethanol-0,25 mol·l⁻¹ PB pH 7,0 1:1 a 1:9 byly velmi podobné nebo došlo k významným snížením proudů píků, nebylo možné využít přídavek DNA k oddělení signálů dvou studovaných látek.

5 LITERATURA

1. Horáková, E.: *Bachelor Thesis*. PřF UK, Praha, 2010.
2. Štěpán, R.: *Diploma Thesis*. PřF UK, Praha, 2001.
3. Zielinska, B.; Samy, S.: Analysis of Nitrated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **386**, 883-890 (2006).
4. Moreira, J. C.; Barek, J.: Analysis of Carcinogenic Nitrated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Química Nova* **18**, 362-367 (1995).
5. Möller, L.: In Vivo Metabolism and Genotoxic Effects of Nitrated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Environmental Health Perspectives* **102**, 139-146 (1994).
6. Tatsumi, K.; Kitamura, S.; Narai, N.: Reductive Metabolism of Aromatic Nitro Compounds Including Carcinogens by Rabbit Liver Preparations. *Cancer Research* **46**, 1089-1093 (1986).
7. Junzo, S.; Shin-Ichi, M.; Osamu, M.; Seiji, H.; Shizuo, S.: Comparison of *in vivo* Binding of Aromatic Nitro and Amino Compounds to Rat Hemoglobin. *Biochemical Pharmacology* **38**, 3511-3519 (1989).
8. Wilson, N. K.; Mccurdy, T. R.: Concentrations and Phase Distributions of Nitrated and Oxygenated Polycyclic Aromatic-Hydrocarbons in Ambient Air. *Atmospheric Environment* **29**, 2575-2584 (1995).
9. Dimashki, M.; Harrad, S.; Harrison, R. M.: Measurements of Nitro-PAH in the Atmospheres of Two Cities. *Atmospheric Environment* **34**, 2459-2469 (2000).
10. Miller-Schulze, J. P.; Paulsen, M.; Toriba, A.; Tang, N.; Hayakawa, K.; Tamura, K.; Dong, L. J.; Zhang, X. M.; Simpson, C. D.: Exposures to Particulate Air Pollution and Nitro-Polycyclic Aromatic Hydrocarbons among Taxi Drivers in Shenyang, China. *Environmental Science & Technology* **44**, 216-221 (2010).
11. Klopman, G.; Tonucci, D. A.; Holloway, M.; Rosenkranz, H. S.: Relationship Between Polarographic Reduction Potential and Mutagenicity of Nitroarenes. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **126**, 139-144 (1984).

12. Priego-López, E.; De Castro, M. D. L.: Ultrasoundassisted Extraction of Nitropolycyclic Aromatic Hydrocarbons from Soil Prior to Gas Chromatography-Mass Detection. *Journal of Chromatography A* **1018**, 1-6 (2003).
13. Bamford, H. A.; Baker, J. E.: Nitro-polycyclic Aromatic Hydrocarbon Concentrations and Sources in Urban and Suburban Atmospheres of the Mid-Atlantic Region. *Atmospheric Environment* **37**, 2077–2091 (2003).
14. Teixeira, E. C.; Garcia, K. O.; Meincke, L.; Leal, K. A.: Study of Nitro-Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Fine and Coarse Atmospheric Particles. *Atmospheric Research* **101**, 631-639 (2011).
15. Schauer, C.; Niessner, R.; Pöschl, U.: Analysis of Nitrated Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Liquid Chromatography with Fluorescence and Mass Spectrometry Detection: Air Particulate Matter, Soot, and Reaction Product Studies. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **378**, 725-736 (2004).
16. Crimmins, B. S.; Baker, J. E.: Improved GC/MS Methods for Measuring Hourly PAH and Nitro-PAH Concentrations in Urban Particulate Matter. *Atmospheric Environment* **40**, 6764-6779 (2006).
17. David, F.; Sandra, P.; Klee, M. S.: Analysis of Nitroaromatics and Nitro-Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Capillary Gas Chromatography with the Agilent 6890 Micro-ECD. (1997).
18. Xu, J.; Lee, F. S. C.: Analysis of Nitrated Polynuclear Aromatic Hydrocarbons. *Chemosphere* **42**, 245-250 (2001).
19. Toledo, M.; Lanças, F. M.; Carrilho, E.: Solid-Phase Extraction of Nitro-PAH from Aquatic Samples and Its' Separation by Reverse-Phase Capillary Liquid Chromatography. *Journal of the Brazilian Chemical Society* **18**, 1004-1010 (2007).
20. Barek, J.; Cvačka, J.; Muck, A.; Quaiserová, V.; Zima, J.: Polarographic and Voltammetric Determination of Carcinogenic Nitro and Amoni Derivates of Polycyclic Aromatic Hydrocarbons. *Electroanalysis* **13**, 799-803 (2001).
21. Jinhui, X.; Lee, F. S. C.: Quantification of Nitrated Polynuclear Aromatic Hydrocarbons in Atmospheric Particulate Matter. *Analytica Chimica Acta* **416**, 111-115 (2000).

22. Mirivel, G.; Riffault, V.; Galloo, J.-C.: Simultaneous Determination by Ultra-Performance Liquid Chromatography–Atmospheric Pressure Chemical Ionization Time-of-Flight Mass Spectrometry of Nitrated and Oxygenated PAHs Found in Air and Soot Particles. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **397**, 243-256 (2010).
23. Chen, X.; Li, M. J.; Yi, C. Q.; Tao, Y.; Wang, X. R.: Electrochemiluminescence Determination of Nitro Polycyclic-Aromatic Hydrocarbons Using HPLC Separation. *Chromatographia* **58**, 571–577 (2003).
24. Delhomme, O.; Herckes, P.; Millet, M.: Determination of Nitro-Polycyclic Aromatic Hydrocarbons in Atmospheric Aerosols Using HPLC Fluorescence with a Post-Column Derivatisation Technique. *Analytical and Bioanalytical Chemistry* **389**, 1953-1959 (2007).
25. Moriishi, H.; Kikuchi, O.; Suzuki, K.; Klopman, G.: Reaction Potential Map Analysis of Chemical-Reactivity. 3. Site Selectivity in SCN-, OCN-, NO₂-, and CH₂CHO- Anions. *Theoretica Chimica Acta* **64**, 319-338 (1984).
26. Bonfantia, L.; Careri, M.; Mangiab, A.; Maninib, P.; Masperoc, M.: Simultaneous Identification of Different Classes of Hydrocarbons and Determination of Nitro-Polycyclic Aromatic Hydrocarbons by Means of Particle Beam Liquid Chromatography-Mass Spectrometry. *Journal of Chromatography A* **728**, 359-369 (1996).
27. Anonymous: http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB7482649.htm, staženo 1.4.2012
28. Anonymous: <http://www.epa.gov/ttn/atw/hlthef/nitrobip.html>, staženo 1.4.2012
29. Anonymous: *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Volume 4: Some Aromatic Amines, Hydrazine and Related Substances, N-Nitroso Compounds and Miscellaneous Alkylating Agents*. IARC, Lyon 1974.
30. Anonymous: <http://www.chemcas.com/msds/cas/msds33/86-00-0.asp>, staženo 3.4.2012
31. Deichmann, W. B.; Macdonald, W. M.; Coplan, M. M.: Paranitrobiphenyl, a New Bladder Carcinogen in the Dog. *Industrial Medicine & Surgery* **27**, 634–637 (1958).
32. Ning, S.; Xiaobai, X.: Reductive Metabolism of 4-Nitrobiphenyl by Rat Liver Fraction. *Carcinogenesis* **18**, 1233–1240 (1997).

33. Purohit, V.; Basu, A. K.: Mutagenicity of Nitroaromatic Compounds. *Chemical Research in Toxicology* **13**, 673-692 (2000).
34. Anonymous: *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Volume 1: Some Inorganic Substances, Chlorinated Hydrocarbons, Aromatic Amines, N-Nitroso Compounds and Natural Products*. IARC, Lyon 1972.
35. El-Bayoumy, K.; Lavoie, E. J.; Hecht, S. S.; Fow, E. A.; Hoffmann, D.: The Influence of Methyl Substitution on the Mutagenicity of Nitronaphthalenes and Nitrobiphenyls. *Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis* **81**, 143-153 (1981).
36. Johnson Jr., H. J.; Cernosek Jr., S. F.; Gutierrez-Cernosek, R. M.: High-Pressure Liquid Chromatography of Some Substituted Biphenyls. *Journal of Chromatography A* **161**, 259-270 (1978).
37. Angerer, J.; Schaller, K. H.; Fleischer, M.; Seiler, H.: Analyses of Hazardous Substances in Biological Materials. *Fresenius' Journal of Analytical Chemistry* **346**, 828-829 (1993).
38. Hernández, P.; Galan-Estella, F.; Hernández, L.: Determination of 4-Nitrobiphenyl by Adsorptive Stripping Square-Wave Polarography. *Analytica Chimica Acta* **271**, 217-221 (1993).
39. Barek, J.; Berka, A.; Müller, M.; Zima, J.: Determination of 4-Nitrobifphenyl and 4-Aminobiphenyl by Controlled Potential Coulometry, DPP a DPV. *Collection Czechoslovak Chemical Communications* **50**, 2853-2862 (1985).
40. Anonymous: <http://www.wolframalpha.com/entities/chemicals/2-nitrobiphenyl/nr/16/zd/>, staženo 2.4.2012
41. Cai, B.-C.; Gao, S.-X.; Lu, G.-F.: β -Cyclodextrin and Its Derivatives-Enhanced Solubility and Biodegradation of 2-Nitrobiphenyl. *Journal of Environmental Sciences* **18**, 1157-1160 (2006).
42. Štěpán, R.; Barek, J.; Mejstřík, V.; Zima, J.: Voltammetric Determination of Carcinogenic Nitrobiphenyls at a Hanging Mercury Drop Electrode. *Sensors* **3**, 43-60 (2003).
43. Anonymous: <http://www.wolframalpha.com/entities/chemicals/3-nitrobiphenyl/al/bz/a5/>, staženo 2.4.2012

44. Anonymous: http://www.chemicalbook.com/ChemicalProductProperty_EN_CB7852550.htm, staženo 4.4.2012
45. Anonymous: <http://monographs.iarc.fr/ENG/Monographs/vol50/mono50-20.pdf>, staženo 4.4.2012
46. Anonymous: http://whqlibdoc.who.int/ehc/WHO_EHC_230.pdf, staženo 4.4.2012
47. Zhong, W. J.; Wang, D. H.; Xu, X. W.; Wang, B. Y.; Luo, Q. A.; Kumaran, S. S.; Wang, Z. J.: A Gas Chromatography/Mass Spectrometry Method for the Simultaneous Analysis of 50 Phenols in Wastewater Using Deconvolution Technology. *Chinese Science Bulletin* **56**, 275-284 (2011).
48. El Mhammedi, M. A.; Achak, M.; Bakasse, M.; Chtaini, A.: Electrochemical Determination of para-Nitrophenol at Apatite-Modified Carbon Paste Electrode: Application in River Water Samples. *Journal of Hazardous Materials* **163**, 323-328 (2009).
49. Rounaghi, G.; Kakhki, R. M.; Azizi-Toupanloo, H.: Voltammetric Determination of 4-Nitrophenol Using a Modified Carbon Paste Electrode Based on a New Synthetic Crown Ether/Silver Nanoparticles. *Materials Science and Engineering: C* **32**, 172-177 (2012).
50. Anonymous: <http://ntp.niehs.nih.gov/ntp/newhomeroc/roc11/nbpub.pdf>, staženo 5.4.2012
51. Anonymous: *IARC Monographs on the Evaluation of Carcinogenic Risks to Humans, Volume 46: Diesel and Gasoline Engine Exhausts and Some Nitroarenes*. IARC, Lyon 1989.
52. Wen, Q.; Chen, Z.; Lian, J.; Feng, Y.; Ren, N.: Removal of Nitrobenzene from Aqueous Solution by a Novel Lipoid Adsorption Material (LAM). *Journal of Hazardous Materials* **209-210**, 226-232 (2012).
53. Wei, W.; Sun, R.; Cui, J.; Wei, Z.: Removal of Nitrobenzene from Aqueous Solution by Adsorption on Nanocrystalline Hydroxyapatite. *Desalination* **263**, 89-96 (2010).
54. Gao, J.; Liu, L.; Liu, X.; Zhou, H.; Wang, Z.; Huang, S.: Concentration Level and Geographical Distribution of Nitrobenzene in Chinese Surface Waters. *Journal of Environmental Sciences* **20**, 803-805 (2008).

55. Ni, Y.; Wang, L.; Kokot, S.: Simultaneous Determination of Nitrobenzene and Nitro-Substituted Phenols by Differential Pulse Voltammetry and Chemometrics. *Analytica Chimica Acta* **431**, 101-113 (2001).
56. Li, Y.-P.; Cao, H.-B.; Liu, C.-M.; Zhang, Y.: Electrochemical Reduction of Nitrobenzene at Carbon Nanotube Electrode. *Journal of Hazardous Materials* **148**, 158-163 (2007).
57. Kippaxdavis, K. J.; Bully, M.; Economou, A.; Fielden, P. R.; Watson, A. F. R.; Alder, J. F.: Electrochemical Behavior of Nitrobenzene in Aqueous Ethanol Studied by Differential-Pulse Polarography. *Analytica Chimica Acta* **284**, 13-19 (1993).
58. Anonymous: <http://www.sigmaaldrich.com/catalog/product/sigma/31149?lang=en®ion=CZ>, staženo 4.4.2012
59. Avery, O. T.; Macleod, C. M.; Mccarty, M.: Studies on the Chemical Nature of the Substance Inducing Transformation of Pneumococcal Types. Inductions of Transformation by a Desoxyribonucleic Acid Fraction Isolated from Pneumococcus Type III. *The Journal of Experimental Medicine* **149**, 297-326 (1979).
60. Watson, J. D.; Crick, F. H. C.: Molecular Structure of Nucleic Acids: A Structure for Deoxyribose Nucleic Acid. *Nature* **171**, 737-738 (1953).
61. Voet, D.; Voet, J. G.: *Biochemie*. Praha, Victoria Publishing 1995.
62. Bernstein, C.: http://www.scitopics.com/DNA_Damage_and_Cancer.html, staženo 10.4.2012
63. Mikkelsen, O.; Schroder, K. H.: Amalgam Electrodes for Electroanalysis. *Electroanalysis* **15**, 679-687 (2003).
64. Yosypchuk, B.; Barek, J.: Vlastnosti pevných a pastových amalgámových pracovních elektrod odlišné od elektrod z kovové rtuti. *Chemické listy* **103**, 284–290 (2009).
65. Barek, J.; Moreira, J. C.; Zima, J.: Modern Electrochemical Methods for Monitoring of Chemical Carcinogens. *Sensors* **5**, 148-158 (2005).

66. Vyskočil, V.; Daňhel, A.; Fischer, J.; Novotný, V.; Deýlová, D.; Horáková, E.; Barek, J.; Yosypchuk, B.; Wang, J.: Silver Solid Electrodes - A Look Back at the Last Five Years of Their Development and Applications. *Sensing in Electroanalysis* **5**, (2010).
67. Daňhel, A.; Pecková, K.; Čížek, K.; Barek, J.; Zima, J.; Yosypchuk, B.; Navrátil, T.: Voltammetric Determination of Genotoxic Dinitronaphthalenes with Meniscus-Modified Silver Solid Amalgam Electrode. *Chemické listy* **101**, 144–149 (2007).
68. Pecková, K.; Vrzalová, L.; Bencko, V.; Barek, J.: Voltammetric and Amperometric Determination of N-Nitroso Antineoplastic Drugs at Mercury and Amalgam Electrodes. *Collection Czechoslovak Chemical Communications* **74**, 1697-1713 (2009).
69. Barek, J.; Fischer, J.; Navrátil, T.; Pecková, K.; Yosypchuk, B.: Silver Solid Amalgam Electrodes as Sensors for Chemical Carcinogens. *Sensors* **6**, 445-452 (2006).
70. Barek, J.; Yosypchuk, B.; Opekar, F.; Švancara, I.; Ferancová, A.; Labuda, J.; Fojta, M.; Navrátil, T.; Nesměrál, K.; Novotný, L.: *Možnosti inovací v elektroanalytické chemii*. Praha, Česká společnost chemická 2006.
71. Asadpour-Zeynali, K.; Soheili-Azad, P.: Simultaneous Polarographic Determination of 2-Nitrophenol and 4-Nitrophenol by Differential Pulse Polarography Method and Support Vector Regression. *Environmental Monitoring and Assessment* **184**, 1089-1096 (2011).
72. Liu, A.-L.; Wang, K.; Chen, W.; Gao, F.; Cai, Y.-S.; Lin, X.-H.; Chen, Y.-Z.; Xia, X.-H.: Simultaneous and Sensitive Voltammetric Determination of Acetaminophen and Its Degradation Product for Pharmaceutical Quality Control and Pharmacokinetic Research by Using Ultrathin Poly(calconcarboxylic Acid) Film Modified Glassy Carbon Electrode. *Electrochimica Acta* **63**, 161-168 (2012).
73. Liu, A.-L.; Wang, J.-D.; Chen, W.; Xia, X.-H.; Chen, Y.-Z.; Lin, X.-H.: Simultaneous and Sensitive Determination of Procaine and Its Metabolite for Pharmaceutical Quality Control and Pharmacokinetic Research by Using a Graphite Paste Electrode. *Journal of Solid State Electrochemistry* **16**, 1343-1351 (2011).
74. Ni, Y.; Qiu, P.; Kokot, S.: Simultaneous Determination of Three Organophosphorus Pesticides by Differential Pulse Stripping Voltammetry and Chemometrics. *Analytica Chimica Acta* **516**, 7-17 (2004).

75. Ni, Y.; Kokot, S.; Selby, M.; Hodgkinson, M.: Simultaneous Polarographic Analysis of Pyrazine and Its Methyl Derivatives by Iterative Target Transformation Factor Analysis. *Analytica Chimica Acta* **316**, 233-238 (1995).
76. Ni, Y.; Jin, L.: Simultaneous Polarographic Chemometric Determination of Lead, Copper, Vanadium, Cadmium and Nickel. *Chemometrics and Intelligent Laboratory Systems* **45**, 105-111 (1999).
77. Harvey, D.: *Modern Analytical Chemistry*. Toronto, The McGraw-Hill Companies 2000.